

HPLC法同时测定杆菌肽原料药中主成分的含量及有关物质

王茉莉*, 宋更申, 常俊山(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0834-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.40

摘要 目的:建立同时测定杆菌肽原料药中主成分的含量及有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为XTerra MS[®] C₁₈,流动相为水-0.2 mol/L磷酸氢二钾溶液(用磷酸调节pH至6.0)-甲醇-乙腈(28:14:52:6, V/V/V/V),主成分杆菌肽A检测波长为254 nm,杆菌肽F(杂质F)检测波长为300 nm,柱温为30 ℃,流速为1.0 ml/min,进样量为100 μl。结果:杆菌肽A质量浓度在0.4~4 mg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤0.5%;平均加样回收率为100.1%,RSD为0.5%($n=9$)。主成分杆菌肽A与其他成分分离度较好;杂质F含量在6.0%以下。结论:本方法操作简便、快捷,结果准确、可靠,可用于杆菌肽原料药的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;杆菌肽原料药;主成分;有关物质

Simultaneous Determination of Main Components and Related Substance in Bacitracin by HPLC

WANG Mo-li, SONG Geng-shen, CHANG Jun-shan(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of main components and related substance in bacitracin. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on XTerra MS[®] C₁₈ column with mobile phase consisted of water-0.2 mol/L dibasic potassium phosphate solution (pH adjusted to 6.0)-methanol-acetonitrile (28:14:52:6, V/V/V/V). The detection wavelength for bacitracin A was set at 254 nm for main components and 300 nm for bacitracin F. The column temperature was set at 30 ℃, the flow rate of 1.0 ml/min and the sample size was 100 μl. RESULTS: The linear range of bacitracin A was 0.4-4 mg/ml($r=0.999\ 9$) with an recovery of 100.1% (RSD=0.5%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 0.5%. Main component bacitracin A was separated from other components well. The content of bacitracin F was less than 6.0%. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and reliable, and it is applicable for the quality control of bacitracin.

KEYWORDS HPLC; Bacitracin; Components; Related substance

杆菌肽(Bacitracin)是由枯草杆菌和地衣芽孢杆菌产生的一种环肽,属于多肽类抗菌药物。杆菌肽至少有7种同系物,包括杆菌肽A、B(B₁、B₂、B₃)、C(C₁、C₂、C₃)、D、E、F、G等,其活性由杆菌肽A至杆菌肽G递减^[1]。杆菌肽的抗菌谱与青霉素相似,对肺炎双球菌、葡萄球菌、淋球菌、脑膜炎双球菌及螺旋体等均有杀灭作用,主要用于治疗耐青霉素的葡萄球菌感染^[2]。由于其副作用大,在临床上主要是外用。涉及后颅窝硬脑膜的耳神经外科手术有可能发生伤口感染、脑脊液漏或脑膜炎等严重并发症,使用杆菌肽液进行局部冲洗可减少伤口感染及并发症的发生率,用药后患者未发现有过敏及耳毒性或肾毒性发生^[3]。杆菌肽还是一种治疗肠阿米巴病的无毒性药物^[4]。此外,杆菌肽在治疗眼科疾病方面效果良好。有研究设计了一项从结膜炎、睑缘炎分离菌的药物敏感性对照试验,结果显示杆菌肽/多黏菌素B的复合物疗效最好,敏感率为93%^[5]。笔者参考相关文献^[6-10],采用高效液相色谱(HPLC)法对杆菌肽原料药中的主成分的含量及有关物质进行了测定,以为更好地控制杆菌肽产品质量提供科学依据。

1 材料

Waters 2695 HPLC仪,包括2695型四元梯度泵、2487型紫外检测器(美国Waters公司);DIONEX-Ultimate 3000 HPLC

仪,包括变色龙色谱工作站、二极管阵列检测器(美国戴安公司);XS205电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)

杆菌肽A对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130320-200709,效价:66 U/mg);杆菌肽原料药(华北制药股份有限公司,批号:070701、070702、070703,效价:68 U/mg);磷酸氢二钾、磷酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)均为分析纯,乙腈、甲醇均为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 精密称取杆菌肽原料药50 mg,置于25 ml量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.2 系统适用性溶液 精密称取杆菌肽A对照品20 mg,置于10 ml量瓶中,加流动相2 ml和稀盐酸0.2 ml溶解,加流动相定容,摇匀,作为系统适用性溶液。

2.1.3 对照溶液 精密量取“2.1.1”项下供试品溶液5 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相定容,摇匀,作为对照溶液。

2.1.4 灵敏度检测溶液 精密量取“2.1.3”项下对照溶液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相定容,摇匀,作为灵敏度检测溶液。

2.1.5 杆菌肽F(杂质F)定位溶液 精密称取杆菌肽原料药50 mg,置于25 ml量瓶中,加EDTA-2Na溶液5 ml溶解后定容,摇匀,于沸水浴中加热30 min,冷却至室温,作为杂质F定位溶液。

* 主管药师,硕士。研究方向:药品检验、药物分析。电话:0311-85212008-8029。E-mail: moliwang_003@163.com

2.1.6 空白溶液 40 mg/ml的EDTA-2Na溶液(用0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节pH至7.0)。

2.2 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱:XTerra MS® C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:水-0.2 mol/L 磷酸氢二钾溶液(用磷酸调节pH至6.0)-甲醇-乙腈(28:14:52:6, V/V/V/V),流速:1.0 ml/min;主成分杆菌肽A检测波长:254 nm,杂质F检测波长:300 nm;柱温:30 ℃;进样量:100 μl。取“2.1.2”项下系统适用性溶液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,杆菌肽B₁的峰顶到基线的高度(HP)与杆菌肽B₁和B₂之间的峰谷到基线的高度(HY)之间的比值大于1.2,各成分的分离度均符合要求。本研究所的系统适用性试验色谱图与《英国药典》中所附色谱图比较^[1],各峰的出峰顺序和位置基本一致,详见图2。杆菌肽A、B₁、B₂和B₃,杆菌肽B₁之前洗脱的杂质,均可参照表1所列各成分的相对保留时间值来判断具体峰位。

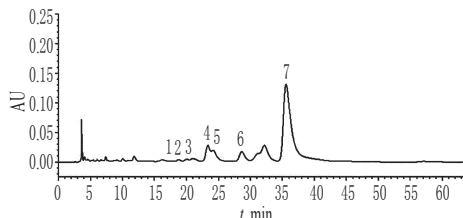


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1.杆菌肽C₁;2.杆菌肽C₂;3.杆菌肽C₃;4.杆菌肽B₁;5.杆菌肽B₂;6.杆菌肽B₃;7.杆菌肽A

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

1.bacitracin C₁;2.bacitracin C₂;3.bacitracin C₃;4.bacitracin B₁;5.bacitracin B₂;6.bacitracin B₃;7.bacitracin A

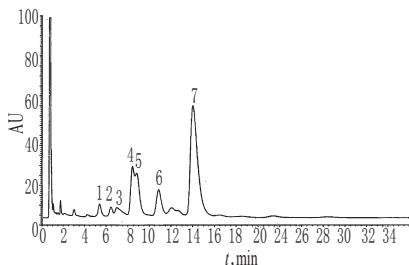


图2 《英国药典》系统适用性试验色谱图

1.杆菌肽C₁;2.杆菌肽C₂;3.杆菌肽C₃;4.杆菌肽B₁;5.杆菌肽B₂;6.杆菌肽B₃;7.杆菌肽A

Fig 2 HPLC chromatogram of system suitability test from British Pharmacopoeia

1.bacitracin C₁;2.bacitracin C₂;3.bacitracin C₃;4.bacitracin B₁;5.bacitracin B₂;6.bacitracin B₃;7.bacitracin A

表1 各成分相对保留时间值

Tab 1 Relative retention time of each component

成分	相对保留时间(近似值)
杆菌肽C ₁	0.5
杆菌肽C ₂	0.6
杆菌肽C ₃	0.6
杆菌肽B ₁	0.7
杆菌肽B ₂	0.7
杆菌肽B ₃	0.8
杆菌肽A	1.0

2.3 线性关系与定量限考察

精密称取杆菌肽A对照品适量,加水溶解,制成浓度约为4 mg/ml的溶液,作为标准溶液I;精密量取标准溶液I 1、2、4、8 ml,分别置于10 ml量瓶中,加水定容,制得标准溶液II~V。按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱,以杆菌肽A峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, mg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $y=2749.5x-672223$ ($r=0.9999$)。结果表明,杆菌肽A质量浓度在0.4~4 mg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。另外,当信噪比≥10时,测得杆菌肽A最低定量限为100 ng。

2.4 专属性试验

取“2.1.1”项下供试品溶液(批号:070701)适量,共5份,1份加入0.1 mol/L 盐酸溶液5 ml,放置8 h,备用;1份加入0.1 mol/L 氢氧化钠溶液2 ml,放置2 h,备用;1份经沸水浴(100 ℃)中加热,放置2 h,备用;1份加入30%过氧化氢溶液5 ml,放置2 h,备用;1份经4 500 lx光照破坏后,放置48 h,备用。分别精密量取上述溶液100 μl,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图3。结果显示,本品在碱、氧化及热破坏条件下,均会发生不同程度的降解,所得的降解产物峰与杆菌肽A色谱峰均能达到良好的分离。

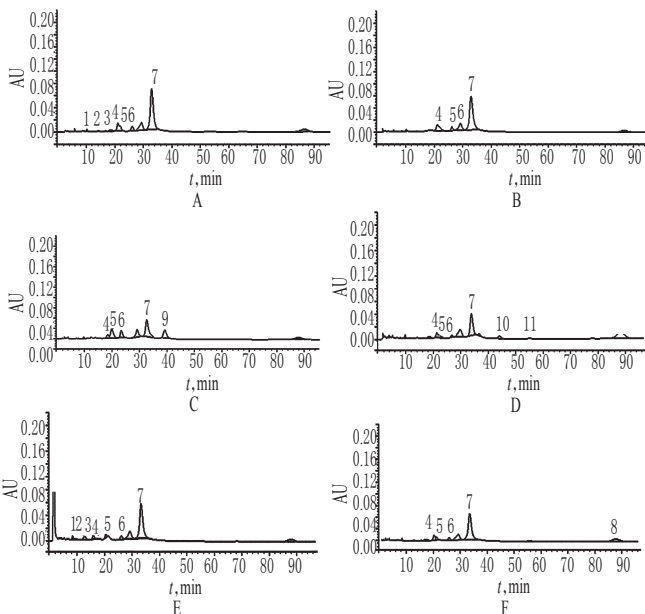


图3 破坏性试验高效液相色谱图

A.未破坏样品;B.酸破坏样品;C.碱破坏样品;D.热破坏样品;E.氧化破坏样品;F.光破坏样品;1.杆菌肽C₁;2.杆菌肽C₂;3.杆菌肽C₃;4.杆菌肽B₁;5.杆菌肽B₂;6.杆菌肽B₃;7.杆菌肽A;8.杂质F;9~11.降解产物

Fig 3 HPLC chromatograms of destructive test

A.undestroyed sample;B.sample destroyed by acid; C.sample destroyed by alkali; D.sample destroyed by heat;E.sample destroyed by oxidation; F.sample destroyed by high light; 1.bacitracin C₁; 2.bacitracin C₂; 3.bacitracin C₃; 4. bacitracin B₁; 5. bacitracin B₂; 6.bacitracin B₃; 7. bacitracin A;8. impurity F;9-11.degradation products

2.5 精密度试验

取“2.1.1”项下供试品溶液(批号:070701)适量,按“2.2”项下色谱条件重复进样6次。结果,杆菌肽A峰面积的RSD为0.2%,表明方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.1.1”项下供试品溶液(批号:070701),分别于室温放

置0、3、6、12、24 h时进样测定。结果,杆菌肽A峰面积的RSD为0.4%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取样品(批号:070701)6份,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果,杆菌肽A峰面积的RSD为0.5%,表明本方法的重复性较好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:070701)适量,共9份,各置于10 ml容量瓶中,分别精密加入杆菌肽A对照品适量,加水溶解并稀释制成质量浓度分别为1.6、2.0、2.4 mg/ml(即80%、100%和120%)的溶液,各3份,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
7.96	7.97	15.95	100.1		
7.88	8.05	15.99	100.4		
7.94	8.12	16.09	100.2		
10.75	10.53	21.19	99.6		
10.78	10.32	21.05	99.8	100.1	0.5
10.66	10.53	21.19	100.4		
12.15	12.14	24.38	100.4		
12.09	12.22	24.30	99.9		
12.17	12.19	24.41	100.2		

2.9 耐用性试验

分别采用XTerra MS[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters XBridge[™] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Ultimate-AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种色谱柱,在相同色谱条件下进行试验。结果,杆菌肽A峰面积的RSD均小于1.5%,可见3种色谱柱所测结果无显著性差异,表明本方法的耐用性良好。

2.10 样品有关物质及主成分的含量测定

取“2.1.1”项下供试品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,依据国外药典中杆菌肽有关物质的检查方法^[11-12],取“2.1.5”项下杂质F定位溶液适量,在300 nm波长处进行检测,以确定杂质F的位置。另取“2.1”项下供试品溶液、系统适用性溶液、对照溶液、灵敏度检测溶液各适量,均在254 nm波长处进行检测。分别记录色谱,按面积归一化法分别计算杆菌肽A、B₁、B₂、B₃含量的总和,其他杂质的百分含量(杆菌肽B₁之前洗脱的多肽类)及杂质F含量,供试品溶液色谱中任何小于对照溶液中主峰面积的峰均可忽略不计,结果见表3。

表3 样品有关物质及主成分的含量测定结果(n=3)

Tab 3 Related substance and content determination of samples(n=3)

批号	杂质F,%	杆菌肽B ₁ 之前洗脱的多肽类,%	杆菌肽A,%	杆菌肽A、B ₁ 、B ₂ 和B ₃ 总和,%
070701	3.8	4.3	71.1	88.3
070702	3.7	4.6	71.2	88.1
070703	3.9	4.5	70.9	88.0

3 讨论

3.1 流动相的选择

由系统适用性试验及专属性试验色谱图可见,本方法能使杆菌肽各成分及其他杂质实现良好分离,与传统的抗菌药物微生物检定法相比,可更加准确地测定杆菌肽主成分和杂质的含量。试验过程中,在仪器与色谱柱相同条件下,若单用甲醇作有机相,流动相洗脱能力差、保留时间长、峰形差。

而本研究中所选择的色谱条件中添加了一定比例的乙腈,可更好地改善峰形,并使各峰间的分离度达到要求;且流动相中的磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钾溶液(用磷酸调节pH至6.0),成本价格低廉,方法简便易行。故选择水-0.2 mol/L酸氢二钾溶液(用磷酸调节pH至6.0)-甲醇-乙腈(28:14:52:6, V/V/V/V)作为本研究的流动相。

3.2 检测波长的选择

通过二极管阵列检测器对供试品溶液进行检测,发现采用254 nm波长测定时,样品中杆菌肽主成分与次要成分均有较强吸收,并在该波长下能检测到较多的相关杂质,故选用254 nm作为测定主成分含量的波长。同法测定杂质F的定位溶液,发现在300 nm波长处杂质F的响应值最高,故选用300 nm波长作为杂质F的检测波长。

3.3 成分的确定

根据文献报道^[13],杆菌肽A是其中最有效和含量最高的,其结构具有4个D型氨基酸,8个L型氨基酸,在直链部分C末端为L-天门冬氨酸的自由羧基和L-赖氨酸的ε-氨基以酰胺键连结成为一个七肽环,在N末端的L-异亮氨酸和L-半胱氨酸之间形成一个吡咯哇琳环。杆菌肽A分子中8位的L-异亮氨酸被缬氨酸所取代形成杆菌肽B。在发酵产物中杆菌肽A和B的含量总和在96%左右。另外,杆菌肽A的吡咯哇琳环在碱性条件下可发生自身氧化,形成没有抗菌活性的杆菌肽F,其他杆菌肽C、D、E、G含量很少。本试验中,采用该方法未检测到杆菌肽D、E、G,且杆菌肽C的含量也较低,杆菌肽A的含量在70%以上,因此,将杆菌肽A作为主成分进行测定。

3.4 该方法的优势与意义

《中国药典》2010年版中收录的该品种含量测定方法为抗菌药物微生物检定法(浊度法和管碟法)^[14]。药典法测定的是杆菌肽中所有活性成分的总体含量,未对各成分含量分别进行测定,且该法试验步骤烦琐、干扰因素多、所需时间长、准确度和精密度较差。此外,药典标准尚未收录有关物质的检查方法,难以对本品进行全面的质量控制。本研究参照《英国药典》(2011版)和《欧洲药典》(7.0版)^[11-12],建立了以HPLC法测定杆菌肽中主成分含量及有关物质的方法。

本试验建立的色谱分析方法全面、清晰地检测出了国内杆菌肽原料药生产厂家所生产样品的成分构成,对其中所含杆菌肽主成分、次要成分及其他杂质的分布状况、比例进行了准确的量化分析。与传统的抗菌药物微生物检定法相比,本法获得的信息更为丰富、更具评估价值,为生产企业改进工艺、提高质量监控水平提供了可供选择的更为先进的科学手段,对提高国内相关产品的质量、安全性及稳定性有重大意义。

综上所述,本方法操作简便、快捷,结果准确、可靠,可用于杆菌肽原料药的质量控制。

参考文献

- [1] 胡立勇,宋友礼.杆菌肽的研究[J].国外医药:抗生素分册,1988,9(1):55.
- [2] Raussens V, Narayanaswan V, Goormaghtigh E, et al. Hydrogen/deuterium exchange kinetics of apolipoprotein-III in lipid-free and phospholipid-bound states[J]. *J Biol Chem*, 1999, 271(38):89.
- [3] 张琪.杆菌肽在耳神经外科中的应用[J].国外医学:耳鼻喉科学分册,1990,14(1):64.
- [4] 程训佳.溶组织内阿米巴的化疗:杆菌肽及其锌盐的体外

HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量

彭明丽*, 赵冠人#, 温筱煦(解放军第309医院药剂科, 北京 100091)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0837-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.41

摘要 目的:建立同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil 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35℃,黄芩苷和绿原酸检测波长为327 nm,木犀草素检测波长为360 nm,进样量为10 μl。结果:黄芩苷、木犀草素、绿原酸质量浓度分别在10.10~202.00、0.10~2.04、0.50~9.96 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 7$ 、 $0.999\ 6$ 、 $0.999\ 7$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;平均加样回收率分别为97.98%、98.15%、97.22%,RSD分别为0.04%、0.70%、0.95%($n=6$)。结论:该方法简便、稳定、重复性好,可用于茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;茵栀黄颗粒;黄芩苷;木犀草素;绿原酸

Simultaneous Determination of Baicalin, Luteolin and Chlorogenic Acid in Yinzhihuang Granules by HPLC

PENG Ming-li, ZHAO Guan-ren, WEN Xiao-xu (Dept. of Pharmacy, No. 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of baicalin, luteolin and chlorogenic acid in Yinzhihuang granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid at the flow rate of 1.0 ml/min (gradient elution). The column temperature was 35℃. The detection wavelength was set at 327 nm for baicalin and chlorogenic acid, and 360 nm for luteolin. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range was 10.10-202.00 μg/ml for baicalin ($r=0.999\ 7$), 0.10-2.04 μg/ml for luteolin ($r=0.999\ 6$) and 0.50-9.96 μg/ml for chlorogenic acid ($r=0.999\ 7$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 1.0%. Average recoveries were 97.98% (RSD=0.04%, $n=6$), 98.15% (RSD=0.70%, $n=6$) and 97.22% (RSD=0.95%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The developed method is simple, stable and reproducible, and can be used for the content determination of baicalin, luteolin and chlorogenic acid in Yinzhihuang granules.

KEYWORDS HPLC; Yinzhihuang granules; Baicalin; Luteolin; Chlorogenic acid

茵栀黄颗粒是由茵栀黄口服液经剂型改革而成,其处方包括茵陈提取物、栀子提取物、黄芩提取物、金银花提取物^[1],主要功效为清热解毒、利湿退黄,临床上主要用于黄疸性肝炎的治疗^[2]。其中,黄芩苷是茵栀黄颗粒中主药黄芩的主要有效

成分,木犀草素和绿原酸是金银花的主要有效成分,三者都具有抗炎、抗菌、抗氧化的作用^[3-5]。2010年版《中国药典》对该药中的黄芩苷和栀子苷进行了质量控制,木犀草素和绿原酸均未被纳入其中。已有的文献报道,有单独对黄芩苷和木犀草

- 研究[J].国外医学:寄生虫病分册,1994,21(5):234.
- [5] 刘美欣,张毅. 外用抗菌剂的比较[J]. 国外医药:抗生素分册,2003,1(24):39.
- [6] 宋如,彭敬梅,张健,等. 高效液相色谱法测定杆菌肽的含量[J]. 河北化工,2009,32(9):701.
- [7] 佟斌,吴兆亮. 高效液相色谱法测定饲料中硫酸粘杆菌素含量[J]. 中国饲料,2007,(5):39.
- [8] Gmur DJ, Bredl CR, Steele SJ, et al. Determination of polymyxin E1 in rat plasma by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 789(2):365.
- [9] 林维宣,孙兴权,田苗,等. 动物组织中粘杆菌素、杆菌肽及维吉尼霉素残留量的液相色谱-串联质谱检测[J]. 分析测试学报,2009,28(2):212.
- [10] 张玉明,倪志华,李琳,等. 高效液相色谱法测定发酵液中杆菌肽A[J]. 理化检验:化学分册,2011,47(5):592.
- [11] British Pharmacopoeia Commission. *BP* 2011[S]. 2011:209-212.
- [12] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 2010[S]. 2010:1 440-1 443.
- [13] Pavli V, Kmetec V. Optimization of HPLC method for stability testing of bacitracin[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24(5/6):977.
- [14] 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,2010:325-326.
- (收稿日期:2014-06-11 修回日期:2014-12-27)
(编辑:陈宏)

* 主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:010-66775321。E-mail: pengmingli9@126.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:010-66775335。E-mail: yanliqun@sohu.com