

RP-HPLC 检测四乙酰基葛根素原料药中的有关物质

周伟¹, 王文苹^{1,2}, 刘姝^{1*}, 杨大坚¹

(1. 深圳市中药药理学及分子药理学研究重点实验室, 深圳 518057; 2. 宁夏医科大学药理学系, 银川 750004)

摘要 目的: 建立检测四乙酰基葛根素 (TAP) 原料药有关物质的方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, Agilent C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (56:44) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 250 nm。结果: TAP 中未检出六乙酰基葛根素 (HAP), 五乙酰基葛根素 (PAP) 及未知杂质的含量均未超过 1%。结论: 本法简便、准确, 可用于控制四乙酰基葛根素 (TAP) 原料药的质量。

关键词: 高效液相色谱法; 四乙酰基葛根素; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0381-03

RP-HPLC determination of related substances of tetra-acetylated puerarin

ZHOU Wei¹, WANG Wen-ping^{1,2}, LIU Cha^{1*}, YANG Da-jian¹

(1. State Key Laboratory of Chinese Medicine and Molecular Pharmacology, Shenzhen 518057, China;

2. Department of Pharmacology Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China)

Abstract Objective To establish a method to determine the related substances of tetra-acetylated puerarin (TAP). **Method** RP-HPLC was adopted for the determination of the related substances of TAP. The chromatographic procedure was carried out with Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and methanol-water (56:44) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 250 nm. **Result** Hexa-acetylated puerarin (HAP) was not found in TAP, and the content of the penta-acetylated puerarin (PAP) and the unknown substances did not exceed 1%. **Conclusion** The method is simple and accurate, and can be used for the quality control of tetra-acetylated puerarin.

Key words HPLC; TAP; related substances

葛根素 (puerarin) 提取自豆科植物葛根 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi), 具有显著的扩张冠状血管和降血压作用^[1], 临床主要用于心脑血管疾病。但葛根素的口服生物利用度低, 而其注射剂用于临床毒性较大, 限制了葛根素的使用范围。为了促进葛根素的口服吸收、降低毒性, 增强其药理活性, 扩大使用范围, 本研究采用对葛根素的脂溶性、水溶性、空间结构有较大影响的基团进行结构改造, 筛选出稳定性和药理活性都较好的四乙酰基葛根素 (TAP)^[2], 但在 TAP 合成过程中可能引入五乙酰基葛根素 (PAP)、六乙酰基葛根素 (HAP) 以及其他未知杂质, 为控制 TAP 的质量, 本实验建立了检测 TAP 原料药中杂质的方法。本法简便、快速, 灵敏度

高, 结果准确可靠。

1 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪 (G1322A Degasser, G1311A Quatump, G1313A ALS, G1316A TCC, G1315B DAD, Agilent 色谱工作站, Agilent 公司); 甲醇为色谱纯 (Fisher U.S.A.), 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水; AUW 220D 十万分之一电子分析天平, 日本岛津公司产; TAP 样品 (批号: 060501, 060502, 060503)、五乙酰基葛根素 (PAP) 工作对照品 (纯度 98.1%) 及六乙酰基葛根素 (HAP) 工作对照品 (纯度 96.7%) 由香港理工大学提供。

2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5

* 通讯作者: Tel (0755) 26737459 E-mail: lily_cha@163.com

μm); 流动相: 甲醇 - 水 (56: 44); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 250 nm ; 进样量: $20 \mu\text{L}$; 柱温: 30°C 。理论板数按 TAP 计算应不低于 5000 按 PAP 计应不低于 5000 HAP 计应不低于 5000。见图 1。

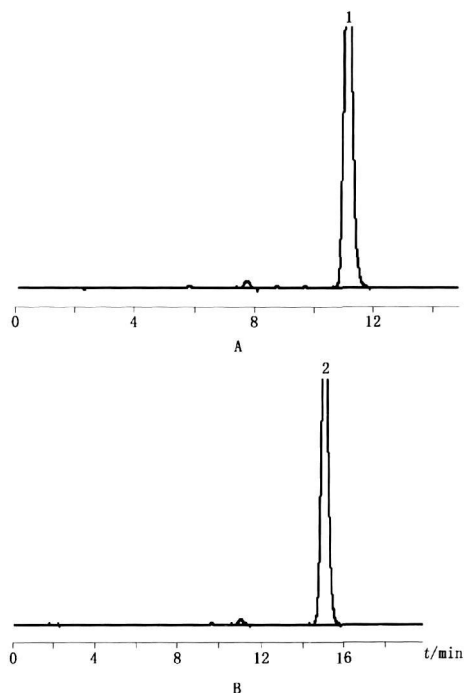


图 1 PAP 对照品 (A) 和 HAP 对照品 (B) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance of PAP (A) and reference substance of HAP (B)

1. PAP (11.17 min) 2. HAP (15.28 min)

3 专属性试验

取 TAP 样品各约 10 mg 经过 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液和 0.3% 双氧水溶液各 50 mL 水浴 (65°C) 加热 30 min 用盐酸溶液及氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 加流动相稀释至 100 mL , 经 HPLC 分析测定。结果表明各降解产物与 TAP 均能良好分离。见图 2。

4 线性考察

4.1 PAP 线性关系试验 取 PAP 工作对照品适量, 精密称定, 加流动相配成 $0.4028 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 分别精密吸取储备液 0.1 、 0.4 、 0.46 、 0.8 、 1.0 、 2.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 各进样 $20 \mu\text{L}$, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 进样浓度 (C , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标作图, 得线性方程:

$$A = 5.423 \times 10^4 C + 7.407 \quad r = 0.9999$$

结果表明 PAP 在 $0.081 \sim 1.611 \mu\text{g}$ 之间呈良好的线性。

4.2 HAP 线性关系试验 取 HAP 工作对照品适量, 精密称定, 加流动相配成 $1.024 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 分别精密吸取储备液 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 各

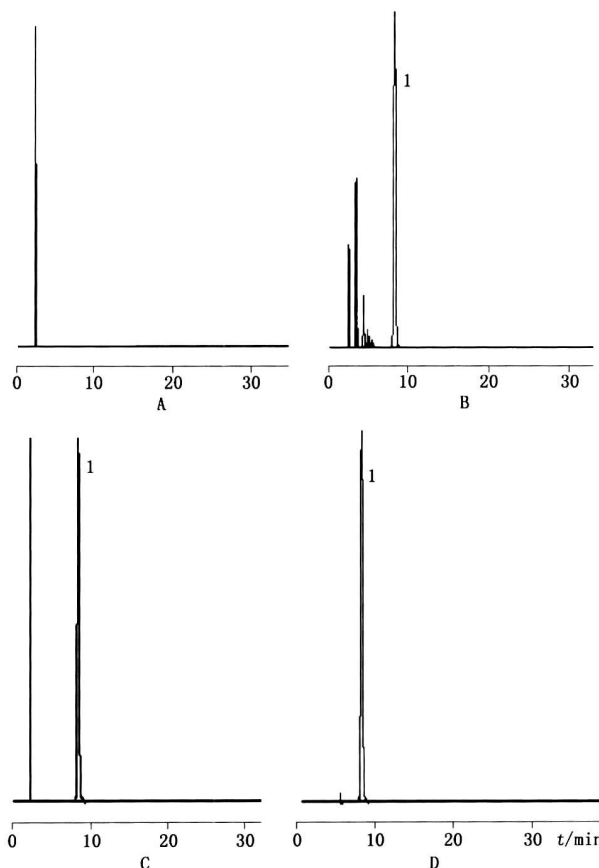


图 2 专属性考察的 HPLC 图谱

Fig 2 The exclusion inspection of HPLC chromatograms

A. 碱热破坏 (heat with $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ test) B. 氧化破坏 (heat with H_2O_2 test) C. 酸热破坏 (heat with $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ test)

D. 未破坏 (without destroy)

1. TAP (8.51 min)

进样 $20 \mu\text{L}$, 以峰面积 (A) 为纵坐标, 进样浓度 (C , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标作图, 得线性方程:

$$A = 4.225 \times 10^4 C + 107.9 \quad r = 0.9992$$

结果表明 HAP 在 $0.2048 \sim 2.048 \mu\text{g}$ 之间呈良好的线性。

5 定量限及检测限测定

用流动相将 PAP、HAP 工作对照品溶液 (储备液) 逐步稀释, 测定 PAP 的 $S/N = 3.1$ 时检测限为 0.0645 ng $S/N = 10.0$ 时定量限为 0.215 ng HAP 的 $S/N = 3.2$ 时检测限为 0.0995 ng $S/N = 10.4$ 时定量限为 0.332 ng 。

6 进样精密性、重复性、稳定性试验

取 PAP 工作对照品溶液 ($0.0510 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、HAP 工作对照品溶液 ($0.0494 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别按上述色谱条件分别连续进样 6 次, 每次 $20 \mu\text{L}$, 6 次测定峰面积的 RSD 分别为 0.03% 和 0.50% ; 同法制

备 6 份 PAP 工作对照品溶液及 6 份 HAP 工作对照品溶液 (浓度均约 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按上述色谱条件测定, RSD 分别为 1.1% 和 0.71%, 结果说明方法的进样精密度和重复性良好。将 PAP、HAP 的工作对照品溶液按上述色谱条件, 分别在制备溶液后的 0、2、4、6、8 h 进样, 结果 PAP、HAP 峰面积在 8 h 内无明显变化, RSD < 2%, 表明溶液稳定性良好。

7 回收率试验

称取 PAP 工作对照品约 25 mg 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解, 定容。精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 即得对照品溶液。称取已测知 PAP 含量 (0.62%) 的 TAP 样品 6 份各约 100 mg 精密称定, 分别置于 100 mL 量瓶, 精密加入 PAP 工作对照品约 25 mg 加流动相溶解, 定容。精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 进样 20 μL , 记录色谱图, 计算回收率, 结果 PAP 的平均回收率 ($n = 6$) 为 101.8%, RSD 为 1.0%。

同法测得 HAP 的平均回收率 ($n = 6$) 为 101.4%, RSD 为 1.4%。

8 有关物质测定

8.1 已知杂质的测定 平行称取 PAP、HAP 工作对照品各 1 份, 每份约 10 mg 精密称定。分别置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度。精密吸取溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 即得对照品溶液。平行称取 3 批 TAP 样品各 2 份, 每份约 70 mg 精密称定。分别置于 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 即得供试品溶液。精密吸取上述溶液 20 μL 分别进样, 记录色谱图, 3 批 TAP 样品中 PAP 的量 ($n = 2$) 分别为 0.92%, 0.62%, 0.63%; 未检测出 HAP。

8.2 自身对照法测定未知杂质的含量 精密吸取“8.1”项下 TAP 供试品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 即得对照溶液。取上述供试品溶液及对照溶液分别进样 20 μL , 记录色谱图至 TAP 保留时间的 2 倍, 见图 3。对照溶液 TAP 色谱峰的峰高约为满量程的 20%。结果见表 1。

9 讨论

在研究有关物质测定方法时, 对于不明确的有关物质, 一般采用高效液相色谱的高低自身对照法来进行。TAP、PAR、HAP 在 320 nm 与 250 nm 处均有吸收波长, HPLC 测定选择 250 nm 为检测波长, 较 320 nm 检测灵敏且对绝大多数杂质均可检出 5 个。

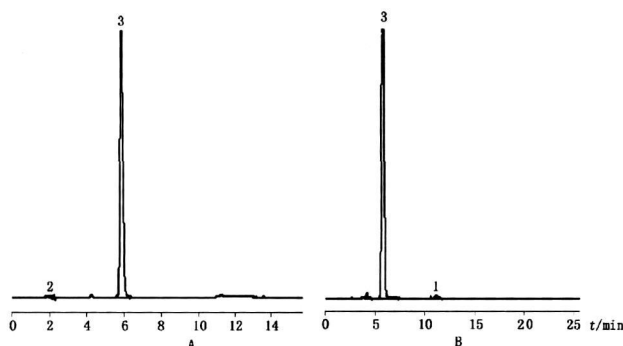


图 3 TAP 有关物质检查色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of related substances of TAP

A. TAP 对照溶液 (reference solution of TAP) B. TAP 供试品溶液 (sample solution of TAP)
1. PAP 3 TAP

表 1 未知杂质的含量

Tab 1 The content of unknown substances

样品号 (sample No.)	对照溶液中 TAP 峰面积 (peak area of reference solution of TAP)	供试品溶液中 杂质总峰面积 (total area of foreign matter in sample solution)	总杂质含量 (content of total foreign matter)
1	398.2	278.7	< 1%
2	381.7	223.8	< 1%
3	381.8	241.8	< 1%

流动相的选择上, 我们考察了不同比例的甲醇与水做为流动相, 当甲醇-水的比例为 56:44 时, 主成分 TAP 与各杂质及降解产物能获得理想的分离效果。

从本品的破坏性试验结果来看, TAP 在热碱性溶液中不稳定, 易分解, 在热酸性溶液和氧化性条件下相对稳定一些。在进行制剂研究时, 可能需体外模拟胃、大肠环境进行酸碱实验, 对剂型的选择具有参考意义。

本法除可用于 TAP 有关物质测定外, 也可用于 TAP 原料药含量测定检查。

参考文献

1. TAN Kan-yu (覃开羽), WU Min (吴敏). Analyze the pharmacological action and the untoward reaction of pur (葛根素的药理作用及不良反应分析). China Pharm (中国药业), 2007, 16(3): 60
2. GUO Dong-yan (郭东艳), YANG Da-jian (杨大坚), CHEN Shi-lin (陈士林). Effects of pur and derivatives on hemorheology of acute blood stasis in rats (葛根素及其衍生物对实验性 SD 大鼠急性血瘀症血液流变学的影响). Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2006, 33(10): 1363

(本文于 2008 年 10 月 18 日修改回)