

茵栀黄注射液中助溶剂葡甲胺 2 种含量测定方法比较

曹玲¹, 王亚超², 冯有龙¹, 罗疆南², 张蕾¹

(1. 江苏省食品药品检验所, 南京 210008; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 目的: 建立并比较 2 种测定茵栀黄注射液中助溶剂葡甲胺含量的方法。方法: 分别采用高效液相色谱-质谱联用法和亲水相互作用色谱法测定茵栀黄注射液中葡甲胺的含量。液质联用法以氨基葡萄糖为内标, 采用 Shim-pak VP-ODS(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1% 甲酸溶液(35:65), 大气压化学离子化, 选择性正离子方式检测。亲水相互作用色谱法采用 Waters XBridge Amide(4.6 mm × 150 mm 3.5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.05 mol·mL⁻¹ 乙酸铵溶液(95:5) 蒸发光散射检测器检测。结果: 2 种方法测定葡甲胺的线性关系均良好, 均具有较强的专属性和重复性, 平均回收率分别为 100.2% 和 98.8%。结论: 2 种方法均可作为茵栀黄注射液中葡甲胺的含量测定方法, 但各有优势。

关键词: LC-APCI-MS/MS; HILIC-ELSD; 中成药; 注射液; 葡甲胺; 助溶剂

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)06-1126-05

Comparison of the determination method of meglumine as cosolvent in Yinzhihuang injection

CAO Ling¹, WANG Ya-chao², FENG You-long¹, LUO Jiang-nan², ZHANG Lei¹

(1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To establish and compare two methods for determination of meglumine as cosolvent in Yinzhihuang injection. **Method:** LC-APCI-MS/MS and HILIC-ELSD were utilized to determine the content of meglumine in Yinzhihuang injection respectively. Gglucosamine was used as internal standard in LC-APCI-MS/MS. The separation was carried out on an Shim-pak VP-ODS column(4.6 mm × 250 mm 5 μm) with the mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid (35:65) (v/v). The detection was performed on a trip-quadrupole tandem mass spectrometer by selected reaction monitoring (SRM) scan mode via atmospheric pressure chemical ionization (APCI). A Waters XBridge Amide column(4.6 mm × 150 mm 3.5 μm) was adopted with mobile phase of methanol-0.05 mol·mL⁻¹ ammonium acetate (95:5) (v/v) and evaporated light scattering detector was used in HILIC-ELSD. **Results:** The two methods were all specific and the linear correlation and repeatability were all well for them. The average recovery were 100.2% and 98.8%, respectively. **Conclusion:** Both methods can be used to control the quality of meglumine as cosolvent in traditional Chinese medicine injections. But each has both advantages and disadvantages.

Key words: LC-APCI-MS/MS; HILIC-ELSD; Chinese patent drug; injection; Meglumine; cosolvent

茵栀黄注射液源于中医名方“茵陈蒿汤”,由茵陈提取物、栀子提取物、金银花提取物及黄芩苷 4 味药组成,具有清热、解毒、利湿、退黄的功效^[1],临床疗效甚佳。茵栀黄注射液处方中采用葡甲胺作为助溶剂,虽然目前尚未见其不良反应的报道,但由于助溶剂大多具有一定的副作用,常常与注射剂中含有的杂质、植物蛋白等发生反应而产生潜在的过敏源^[2],为了进一步提高安全意识,防止生产企业违

规投料,对中药注射剂这种高风险剂型中的助溶剂进行控制还是有必要的。

葡甲胺(Meglumine)为 N-甲基-D-葡糖胺,结构中含有 5 个醇-OH 基和 1 个-NH-基(图 1),分子极性很强;且其结构中不含 C=C 等发色基团,除紫外末端外基本无吸收,中国药典采用酸碱滴定法测定其含量^[3]。作为中药注射剂中常用的助溶剂,由于制剂中成分复杂,干扰成分较多,采用滴

定法测定含量的专属性较差;同时由于葡甲胺为极性较强的碱性药物,在常用反相色谱柱上保留较差,通过 HPLC 法难以达到与干扰成分的有效分离,需要在流动相中添加离子对试剂才能获得良好的保留,极大地限制了检测器的使用。本文利用液质联用技术选择性好,以及亲水相互作用色谱法(HILIC)分析极性化合物的优势^[4],分别建立了茵栀黄注射液中葡甲胺的 HPLC-APCI-MS/MS 以及 HILIC-ELSD 2 种含量测定方法,并进行了比较。

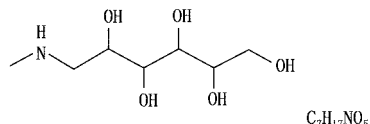


图1 葡甲胺结构式

Fig 1 The structure of meglumine

1 仪器与试剂

Thermo Finnigan Surveyor LC-TSQ Access 高效液相色谱/三级串联四极杆质谱联用仪(美国菲尼根公司), LC-20AB UFLC 高效液相色谱仪(日本岛津公司), Altech 2000 蒸发光散射检测器, Mettler Toledo MX₅ 电子天平。

葡甲胺对照品购自东京化成工业株式会社(批号 GI01); 氨基葡萄糖由中国药品生物制品检定所提供(批号 649-200001); 茵栀黄注射液为市场抽样所得, 分别来自国内 A、B、C、D、E 5 家生产企业; 甲醇、甲酸均为色谱纯, 水为 Millipore 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱-质谱联用法

2.1.1 色谱和质谱条件

色谱条件: 采用 Shim-pak VP-ODS(4.6 mm × 250 mm 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-0.1% 甲酸溶液(35:65); 流速为 0.5 mL · min⁻¹; 柱温为 30 °C。

质谱条件: 采用大气压化学电离离子源(APCI); 喷雾电压 4 kV; 鞘气压力 207 kPa; 离子吹扫气流速 4 Arb; 辅助气流速 5 Arb; 毛细管温度 350 °C; 碰撞气压力 0.2 Pa; 碰撞气能量 16 V。正离子方式选择离子监测(SRM) 检测母离子为 m/z 196.0, 子离子采用信号相对较强且较稳定的 m/z 178.0; 内标氨基葡萄糖检测母离子为 m/z 179.8, 子离子为 m/z 162.0。

2.1.2 溶液的制备

对照品储备液: 取葡甲胺对照品 9.84 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得 98.4

μg · mL⁻¹ 对照品储备液。

内标溶液: 取氨基葡萄糖适量, 加水溶解并稀释成每 1 mL 中含 100 μg 的溶液。

对照品溶液: 精密量取对照品储备液 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得 1.968 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液: 精密量取本品 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度。精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加水稀释至刻度, 即得。

阴性对照溶液: 取不含葡甲胺的阴性样品溶液 1 mL, 同供试品溶液方法制备。

2.1.3 方法专属性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL 分别注入 LC/MS/MS 仪, 记录质谱图, 典型的总离子流和选择离子流图如图 2 所示。结果显示, 本试验所建立的 LC-APCI-MS/MS 法测定葡甲胺及内标峰形较好, 阴性对葡甲胺和内标均无干扰, 基线平稳。葡甲胺的出峰时间约为 2.41 min, 内标的出峰时间约为 2.43 min。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入内标溶液 1 mL, 加水稀释至刻度, 配制成葡甲胺浓度分别为 0.0984, 0.1968, 0.4920, 0.984, 1.968, 4.920, 9.84 μg · mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 摇匀。分别精密量取 10 μL 注入 LC/MS/MS 仪, 记录质谱图。以葡甲胺与内标峰面积的比值 A/A_s 为纵坐标, 葡甲胺浓度 C (μg · mL⁻¹) 为横坐标, 绘制标准曲线。结果回归方程为:

$$A/A_s = 2.205C - 0.2805 \quad r = 0.9996$$

表明葡甲胺在 0.0984 ~ 9.84 μg · mL⁻¹ 浓度范围内与峰面积比 A/A_s 呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取对照品溶液连续进样 6 次, 计算葡甲胺与内标峰面积比值的 RSD 为 2.3%, 表明精密度良好。

2.1.6 溶液稳定性试验 取上述供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 依法测定葡甲胺含量, 结果 RSD 为 2.2%, 表明样品室温放置 8 h 稳定。

2.1.7 重复性试验 按样品测定方法, 取国内 A 厂同一批样品(样品号 3) 6 份, 在相同条件下平行测定, 样品中葡甲胺含量的 RSD 为 2.4%。表明在此质谱条件下, 方法重复性较好。

2.1.8 回收率试验 采用加样回收法, 取国内 A 厂样品(样品号 3, 葡甲胺含量 4.080 mg · mL⁻¹) 5

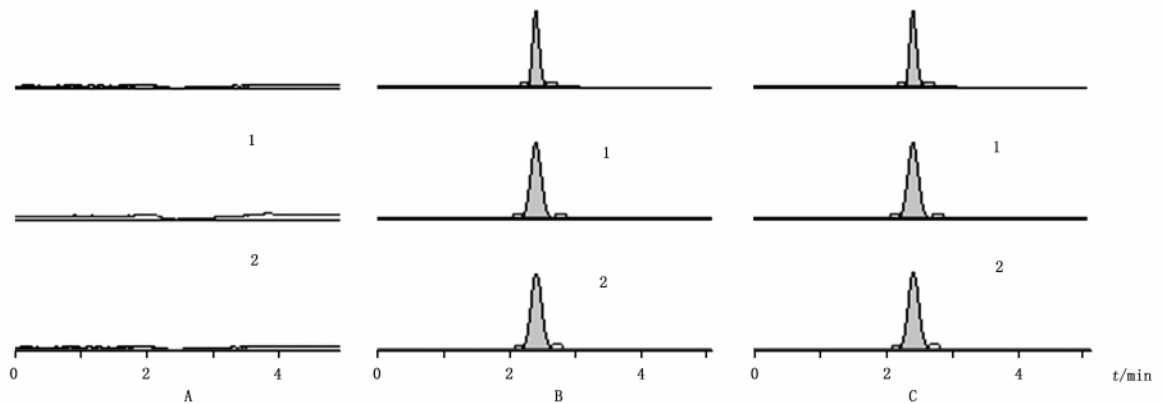


图2 阴性对照(A)、对照品(B)和供试品(C)总离子流和选择离子图

Fig 2 TIC and SRM chromatograms of negative sample without meglumine and internal standard(A), chemical reference substances(B) and sample(C)
1. 葡甲胺(meglumine) 2. 内标氨基葡萄糖(glucosamine; internal standard)

支内容物,混匀,精密量取1 mL,置20 mL量瓶中,加水稀释至刻度。精密量取1 mL,置200 mL量瓶中,分别精密加入葡甲胺对照品储备溶液($98.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1、2、3 mL,内标溶液2 mL,加水稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL 注入LC/MS/MS仪,依法测定,平均回收率($n=9$)为100.1%,结果见表1。

表1 LC-APCI-MS/MS法回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery test by LC-APCI-MS/MS

加入量 (added) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (mean recovery) /%	RSD /%
98.4	99.3	99.6	1.9
98.4	97.9		
98.4	101.61		
196.8	103.31	99.8	3.1
196.8	98.81		
196.8	97.32		
295.2	103.6	101.1	3.9
295.2	96.5		
295.2	103.1		

2.2 亲水作用色谱法

2.2.1 色谱条件 采用Waters XBridge Amide(4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μm)色谱柱;流动相为甲醇-50 mmol \cdot mL $^{-1}$ 乙酸铵溶液(95:5);流速为0.5 mL \cdot min $^{-1}$;蒸发光散射检测器,以空气为载气,流速2.3 L \cdot min $^{-1}$;漂移管温度90 $^{\circ}\text{C}$;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 溶液的制备

对照品储备液:取葡甲胺对照品0.5020 g,置50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得10.04 mg \cdot mL $^{-1}$ 的对照品储备液。

对照品溶液:精密量取对照品储备液2 mL,置

100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得0.2008 mg \cdot mL $^{-1}$ 的对照品溶液。

回收率加样溶液:取葡甲胺对照品52.75 mg,置25 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得2.110 mg \cdot mL $^{-1}$ 的回收率加样溶液。

供试品溶液:精密量取本品1 mL,置20 mL量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

阴性对照溶液:取不含葡甲胺的阴性样品溶液1 mL,同供试品溶液方法制备。

2.2.3 方法专属性试验 取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μL 分别注入液相色谱仪,记录色谱图(如图3所示)。结果显示,葡甲胺峰形较好,阴性无干扰,基线平稳。葡甲胺的出峰时间约为8.9 min。

2.2.4 线性关系考察 精密量取对照品储备液适量,加水稀释成葡甲胺浓度分别为0.05020, 0.1004, 0.2008, 0.3012, 0.4016, 0.5020, 1.004 mg \cdot mL $^{-1}$ 的系列对照品溶液,摇匀。分别精密量取10 μL 注入HPLC仪,记录色谱图。以葡甲胺峰面积的对数 $\ln A$ 为纵坐标,葡甲胺浓度的对数 $\ln C$ 为横坐标,绘制标准曲线。结果回归方程为:

$$\ln A = 1.241 \ln C + 14.48 \quad r = 0.9993$$

表明葡甲胺在0.05020 ~ 1.004 mg \cdot mL $^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液连续进样6次,计算葡甲胺峰面积的RSD为1.3%,表明精密度良好。

2.2.6 溶液稳定性试验 取上述供试品溶液,分别于0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h依法测定葡甲胺含量,结果RSD为0.62%,表明供试品溶液室温放置10 h稳定。

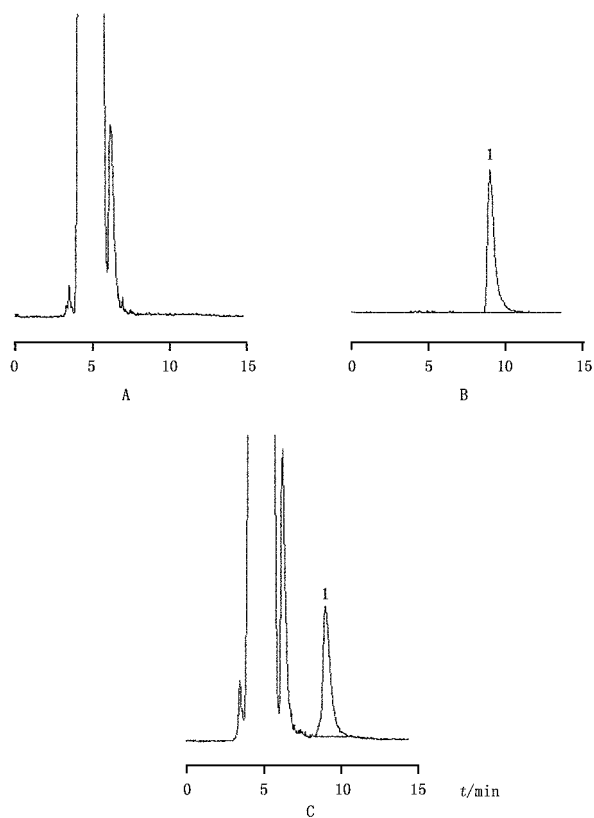


图3 阴性对照(A)、对照品(B)和供试品(C) HPLC图
Fig 3 HPLC chromatograms of negative sample without meglumine(A), chemical reference substances(B) and sample(C)

1. 葡甲胺(meglumine)

2.2.7 重复性试验 按样品测定方法,取国内A厂同一批样品(样品号3)6份,在相同条件下平行测定,样品中葡甲胺含量的RSD为0.74%。结果表明该法重复性良好。

2.2.8 回收率试验 采用加样回收法,取已知含量的A厂同一批样品(样品号3,葡甲胺含量 $4.210 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)5支内容物,混匀,精密量取0.5 mL,置20 mL量瓶中,精密加入葡甲胺回收率加样溶液($2.110 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)0.8,1,1.2 mL,加水稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL 注入HPLC仪,依法测定,平均回收率($n=9$)为98.8%,结果见表2。

2.3 样品测定 取国内5个厂家的样品各3批,依法制备供试品溶液和对照品溶液,分别测定含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 中药注射剂作为近年来发展起来的新剂型,随着不良反应的报道日益增多,有关其安全性方面的研究越来越引起大家的关注。其中,用来提高其溶解性和稳定性的一些助溶剂是产生热原物质和致敏物质的重要因素之一^[5]。为了防止潜在不良反应

表2 HILIC法回收率试验结果($n=3$)

Tab 2 Results of recovery test by HILIC

加入量 (added) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (mean recovery) /%	RSD /%
1.688	98.6	99.1	0.8
1.688	100.0		
1.688	98.6		
2.110	97.8	98.8	1.0
2.110	99.7		
2.110	98.8		
2.532	98.4	98.5	0.1
2.532	98.5		
2.532	98.5		

表3 2种方法含量测定结果比较($n=4$)

Tab 3 Determination results by two methods

生产企业 (manufactory)	样品号 (sample No.)	葡甲胺含量(content of meglumine) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$		相对平均偏差(relative average deviation) /%
		HILIC法	LC/MS	
A	1	3.46	3.27	2.9
	2	3.78	3.76	0.3
	3	4.21	4.08	1.6
B	4	4.64	4.55	1.0
	5	3.18	3.02	2.6
	6	5.98	5.81	1.5
C	7	3.50	3.27	3.4
	8	3.48	3.40	1.2
	9	3.57	3.39	2.6
D	10	4.36	4.22	1.7
	11	4.51	4.24	3.1
	12	4.81	4.66	1.6
E	13	4.41	4.23	2.1
	14	4.40	4.17	2.7
	15	4.41	4.47	0.7

的发生,本文建立了茵栀黄注射液中助溶剂葡甲胺的HPLC-APCI-MS/MS以及HILIC-ELSD 2种含量测定方法。

3.2 葡甲胺为水溶性辅料,采用LC-MS/MS法测定其含量时,本文在流动相水中加入了0.1%甲酸,以提高离子化效率。同时考察了电喷雾离子化和大气压化学离子化的区别,结果电喷雾离子化测定时基质效应较高,采用大气压化学电离时,有效改善了基质效应。

3.3 葡甲胺是强极性化合物,在传统的反相 C₁₈ 色谱柱上保留很差。亲水作用色谱(HILIC)是采用极性固定相、高含量极性有机溶剂-水相缓冲液为流动相的一种分离技术,能有效地解决强极性化合物在反相色谱中保留弱或难以保留的问题;同时由于流动相组成简单,解决了离子对试剂与检测器不兼容的缺点。

3.4 2种测定方法均具有较好的专属性,准确度、精密度高,含量测定结果的相对平均偏差在3.5%以内,结果基本一致。与HILIC-ELSD法相比,HPLC-APCI-MS/MS方法检测限低,对色谱柱的要求不高,分析速度快,但对仪器的要求较高,同时需采用内标法进行定量,操作较为烦琐。HILIC-ELSD法简单、经济适用,只要配备一根适宜的色谱柱,在普通的HPLC色谱仪上即可实现分离;但缺点是灵敏度不够高,色谱柱的应用范围还不够广泛。虽然两种方法各有优势,但均可为中药注射剂中葡甲胺的质量控制提供思路。

3.5 茵栀黄注射液目前收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第十四册^[6],处方中规定葡甲胺加入量为3 mg · mL⁻¹,从测定结果来看,产品的各企业之间、企业批与批之间尚存在一定的差异,应对其加以控制。

参考文献

- 1 CHEN Hui - yang(陈辉扬),CHEN Jun(陈军),WEN Ping - kang(温平康). Pharmacodynamics and clinical evaluation of Yinzhihuang injection(茵栀黄注射液的药理作用与临床应用评价). *Drug Evaluation*(药品评价) 2005 5:122
- 2 WU Yi(吴毅),LIANG Cheng - gang(梁成罡),JIN Shao - hong(金少鸿) *et al.* SEC - ELSD determination of polysorbate 80 in traditional Chinese medicine injections(SEC - ELSD法测定中药注射液中聚山梨酯80的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008 28(1):12
- 3 ChP(中国药典). 2005. Vol II(二部):690
- 4 LI Rui - ping(李瑞萍),HUANG Jun - xiong(黄骏雄). Hydrophilic interaction chromatography and its applications in the separation of basic drugs(亲水作用色谱及其在碱性药物分析中的应用). *Prog Chem*(化学进展) 2006 18(11):1508
- 5 ZENG Cong - yan(曾聪彦),MEI Quan - xi(梅全喜). Causes for adverse reactions of traditional Chinese medicine injections: A case study of the "houuttunya cordata injection event"(从“鱼腥草注射液事件”看中药注射剂不良反应产生的根源). *China Pharm*(中国药房) 2007 18(6):401
- 6 Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Public Health, P R China(中华人民共和国卫生部药典委员会编). Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Chinese Traditional Patent Formulation Praeparatum Vol 14(中华人民共和国卫生部药典标准·中药成方制剂第十四册). 1998

(本文于2010年9月1日收到)

《药物分析杂志》继续被评为 2011 年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了2010年度精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目总结验收及2011年度精品科技期刊新增示范项目评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为2011年度精品科技期刊示范项目C类项目。评选分A、B、C三类,各类项目资助额度分别为每项25万、15万、5万元/年。中国科协从2006年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续6年被评为中国科协精品科技期刊示范项目(C类)。