

高效液相色谱法测定金糖宁胶囊中 1-脱氧野尻霉素的含量

于娟¹, 杜守颖^{2*}, 吴丽璇¹, 陈啟兰¹

(1. 漳州片仔癀药业股份有限公司, 福建漳州 363000;

2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**建立反相高效液相色谱-柱前衍生化法测定金糖宁胶囊中1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)的含量。**方法:**样品经处理过的D001-CC型阳离子交换树脂上用氨水洗脱收集后,用 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)柱前衍生化,再采用高效液相色谱-二极管阵列检测器测定。ODS- C_{18} 色谱柱($4.0\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),流动相乙腈-0.2%磷酸溶液梯度洗脱,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长263 nm,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。**结果:**1-脱氧野尻霉素在 $0.84\sim 8.4\text{ }\mu\text{g}$ 线性关系良好($r=1.0000$),精密度RSD 0.3%,重复性RSD 0.6%,衍生化后的样品溶液在24 h内稳定,平均回收率109.6%,RSD 0.4%。**结论:**该方法稳定可靠,重复性好,精密度高,可用于金糖宁胶囊中1-脱氧野尻霉素的含量测定。

[关键词] 1-脱氧野尻霉素; 金糖宁胶囊; 柱前衍生化; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0062-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180062

Determination of 1-Deoxynojirimycin in Jintangning Capsules by HPLC YU Juan¹, DU Shou-ying^{2*}, WU Li-xuan¹, CHEN Qi-lan¹ (1. *Zhangzhou Pien Tze Huang Pharmaceutical Co. Ltd.*, Zhangzhou 363000, China; 2. *Beijing University of Chinese Medicine*, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method of determination of 1-deoxynojirimycin in Jintangning capsules. **Method:** The samples were collected after elution with ammonia by processed D001-CC type positive cation exchange resin and pre-column derivatization with the concentration of $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc-Cl) and then determined by DAD detector. ODS- C_{18} ($4.0\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$) was eluted with the mobile phase of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid in a gradient mode. The flow rate was $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the detection wavelength was 263 nm, and column temperature at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Result:** 1-deoxynojirimycin had good linear relationships within the range of $0.84\sim 8.4\text{ }\mu\text{g}$ ($r=1.0000$), with the precision RSD of 0.3% and repetition RSD of 0.6%, the sample solution after derivatization was stable within 24 hours. The average recovery was 109.6%, and the relative standard deviations were 0.4%. **Conclusion:** The method is stable, reliable and accurate, and can be used for the determination of 1-deoxynojirimycin in Jintangning capsules.

[Key words] 1-deoxynojirimycin; Jintangning capsules; pre-column derivatization; RP-HPLC

金糖宁胶囊由蚕沙和甘草两味中药材组成,具有化浊祛湿、活血定痛的功效,用于2型糖尿病属湿浊中阻兼血瘀证,是漳州片仔癀药业股份有限公司开发的新药品种。方中蚕沙具有祛风除湿、活血定痛的功效。蚕沙含有多种氨基酸、微量元素和生物碱等有效成分,近年研究表明,蚕沙提取物和蚕沙总

生物碱具有抗糖尿病作用^[1-3]。蚕沙质量标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药材)第一册,药材标准中没有有效成分的含量测定。金糖宁胶囊现有产品注册标准规定测定蚕沙中派可林酸的含量,但根据临床试验结果,金糖宁胶囊治疗2型糖尿病的有效物质主要是蚕沙中的生物碱成分,其

[收稿日期] 20150121(002)

[基金项目] 福建省科技重大专项(2006YZ0001-4)

[第一作者] 于娟,高级工程师,从事药品质量控制与分析工作, Tel:13906945397, E-mail:13906945397@163.com

[通讯作者] * 杜守颖,博士,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新技术研究, Tel:010-84738645, E-mail:doushouying@263.com

中 1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)为治疗糖尿病的主要活性成分。1-DNJ 在紫外-可见光区域无吸收,用蒸发光检测器的准确度和重复性相对较差。近年有采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定桑白皮和桑叶中 1-DNJ 或总生物碱的含量^[4-7],未见关于金糖宁胶囊中 1-DNJ 或生物碱含量测定的相关研究报道^[8]。为了建立金糖宁胶囊中该活性成分的质量标准,根据制剂质量控制的要求,需同时建立蚕沙的质量标准。本研究根据 1-DNJ 的化学结构特征,选用茱甲氧羰酰氯(FMOC-C1)衍生化-高效液相色谱法二极管阵列检测器来测定 1-DNJ 的含量。

1 仪器与试剂

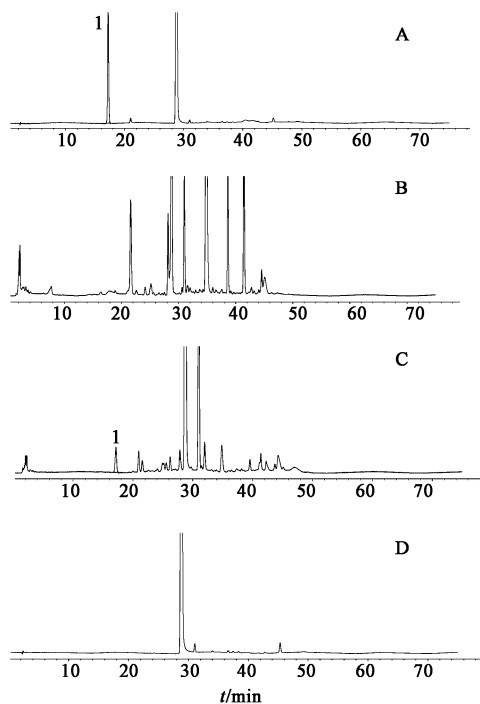
1200 系列高效液相色谱仪(DAD 检测器,美国 Agilent 公司),MilliQ-Gradient 型超纯水器(密理博 MilliQ-G)。1-DNJ 对照品(Sigma 公司,批号 11050502),FMOC-LL(Sigma 公司,批号 0001412394),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。10 批金糖宁胶囊由漳州片仔广药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱(4.0 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min,25% A;8~45 min;25%~50% A;46~75 min,50%~25% A),检测波长 263 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25℃。理论塔板数按 1-DNJ 峰计算不低于 6 000。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取 1-DNJ 对照品适量,精密称定,加水制成 0.2 g·L⁻¹ 的溶液。精密量取 1 mL 至 25 mL 量瓶中,加入 2% NaHCO₃ 溶液 1 mL,振摇 10 s,精密加入 2 g·L⁻¹ 的 FMOC-CL 的乙腈溶液 4 mL,振摇 10 s,30℃ 水浴反应 40 min,用 50% 乙腈定容至 25 mL,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取金糖宁胶囊研细,取约 1 g,精密称定,置 100 mL 烧杯中,加酸水 50 mL(浓盐酸调 pH 3~4),搅拌均匀,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz) 30 min,离心 10 min(4 000 r·min⁻¹),分取上清液,残渣加酸水适量洗涤,离心 10 min(4 000 r·min⁻¹),合并上清液,浓缩至约 20 mL。置已处理过的 D001-CC 型阳离子交换树脂柱[树脂体积 50 mL,径(2.5 cm)-高(1:8),H⁺],先用水 60 mL 洗脱,弃去洗脱液,再用 0.5 mol·L⁻¹ 氨水 600 mL 洗脱(洗脱速度 2.5 mL·min⁻¹),收集氨水洗脱液,浓缩至近干,加水 10 mL,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz) 2 min,转移至 25 mL 量瓶中,加水



1. 1-脱氧野尻霉; A. 对照品; B. 缺蚕沙阴性样品; C. 样品; D. 试剂空白

图 1 金糖宁胶囊 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatography of Jintangning capsule

至刻度,摇匀。精密量取 1 mL,至 25 mL 量瓶中,加入 2% NaHCO₃ 溶液 1 mL,振摇 10 s,精密加入 2 g·L⁻¹ 的 FMOC-Cl 乙腈溶液 4 mL,振摇 10 s,30℃ 水浴反应 40 min,用 50% 乙腈定容至 25 mL,即得。

2.4 线性关系考察 精密称取 1-DNJ 对照品适量,加水溶解,制成 0.420 g·L⁻¹ 的对照品溶液(I),精密吸取对照品溶液(I) 2 mL,至 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,制成 0.084 g·L⁻¹ 的对照品溶液(II)。按 2.2 项下方法处理,分别制得对照品溶液①,②。精密吸取对照品溶液① 10, 20 μL,对照品溶液② 5, 10, 15, 20 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,以对照品进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,结果 1-DNJ 回归方程 $Y = 229.83X + 10.471$ ($r = 1.0000$),表明 1-DNJ 在 0.84~8.4 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取 1-DNJ 0.365 g·L⁻¹ 的对照品溶液 1 mL,至 25 mL 量瓶中,加入 2% NaHCO₃ 溶液 1 mL,振摇 10 s,精密加入 2 g·L⁻¹ 的 FMOC-Cl 乙腈溶液 4 mL,振摇 10 s,30℃ 水浴反应 40 min,用 50% 乙腈定容至 25 mL,精密吸取 20 μL,连续重复测定 5 次,结果峰面积计 RSD 0.3%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取金糖宁胶囊样品(批号1002001)溶液,分别在制备后0,1,6,14,20,24 h进样,按2.1项下色谱条件进行分析,结果峰面积的RSD 1.4%。表明样品在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取金糖宁胶囊样品(批号1002001)6份,按2.3项下方法制备,2.1项下色谱条件测定,结果1-DNJ质量分数平均值为3.55 mg·g⁻¹,RSD 0.6%,表明该方法的重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的同一批金糖宁样品(批号1002001)6份,每份约0.5 g,分别精密加入一定量的1-DNJ对照品,按2.3项下方法制备供试品溶液,2.1项下色谱条件测定,结果见表1。

表1 金糖宁胶囊中1-DNJ加样回收试验

Table 1 Recovery test of 1-DNJ in Jintangning capsules

称样量 /g	样品中量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.500 2	1.775 7	3.731 1	108.6	109.6	0.4
0.509 4	1.808 4	3.784 0	109.7		
0.508 7	1.805 9	3.774 5	109.3		
0.501 6	1.780 7	3.751 9	109.5		
0.505 8	1.795 6	3.768 2	109.6		
0.505 7	1.795 2	3.766 2	109.5		

注:加入量均为1.800 5 mg。

2.9 样品含量测定 分别对10批金糖宁胶囊按上述方法进行测定,结果1-DNJ质量分数分别为1.95, 2.40, 2.27, 1.08, 1.09, 1.25, 0.94, 1.03, 1.17, 1.06 mg/粒。

3 讨论

本文建立了采用衍生化-反相高效液相色谱-二极管阵列检测器测定金糖宁胶囊中1-DNJ的方法,该方法亦可用于测定蚕沙中1-DNJ的含量,通过合理控制原料质量,保证原料与成品有效成分测定的相关性。经方法学考察,该方法稳定可靠、重现性好,在该产品质量标准提高方面具有重要意义。

3.1 衍生化条件的考察

3.1.1 2% NaHCO₃ 溶液用量、茚甲氧羰酰氯乙腈溶液用量对衍生化反应的影响 每组分别精密加入2% NaHCO₃ 溶液0.5, 1, 1.5 mL,分别精密加入2 g·L⁻¹的茚甲氧羰酰氯乙腈溶液(FMOC-Cl)2, 4, 5 mL,结果表明采用2% NaHCO₃ 溶液1 mL, 2 g·L⁻¹茚甲氧羰酰氯乙腈溶液4 mL,可以使衍生化反应完全。

3.1.2 反应温度和反应时间对衍生化反应的影响 比较将供试品分别置于20, 30, 40℃水浴中,反应时间依次为20, 30, 40 min,结果表明采用30℃水

浴反应40 min,可以使衍生化反应完全。

3.2 提取方法的选择

3.2.1 提取溶剂的量及提取时间的选择 采用水50, 100 mL,超声30, 60 min,回流60 min,对的金糖宁胶囊(批号1002001)进行提取,测定1-DNJ含量,结果表明用水50 mL,超声30 min提取样品,就可将样品提取完全。

3.2.2 洗脱溶剂体积考察 采用0.5 mol·L⁻¹氨水400, 500, 600, 700 mL分别洗脱,对金糖宁胶囊(批号1002001)进行提取,测定1-DNJ含量,结果表明用0.5 mol·L⁻¹氨水600 mL洗脱能够将1-DNJ洗脱完全。

3.2.3 洗脱速度考察 采用0.5 mol·L⁻¹氨水600 mL洗脱,洗脱速度分别为1, 2.5, 5, 8 mL·min⁻¹,对金糖宁胶囊(批号1002001)进行考察,测定1-DNJ含量,结果表明用2.5 mL·min⁻¹的洗脱速度结果较好。

3.3 回收率结果的讨论 金糖宁胶囊中1-DNJ加样回收试验结果略偏高,是由于样品前提取方法操作步骤较多,可能导致影响测定结果的因素也相应较多,但回收率结果还是符合分析过程较复杂样品的规定。

[参考文献]

[1] 刘振,尹国寅,龚佑祥,赵宁. HPLC-ELSD在1-脱氧野尻霉素,葡萄糖和葡萄糖胺的杂志分析中的应用[J]. 分析实验室, 2007, 26(7): 83-86.

[2] 施明毅,李建利,卢先明,普元柱. 蚕沙研究概况[J]. 中药与临床, 2013, 4(1): 53-56.

[3] 孙伟,黄江波,徐文祈. 超声波辅助提取蚕沙中类黄酮的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15465-15466.

[4] 陈松,刘宏程,储一宁,等. 12个桑树品种桑叶中的1-脱氧野尻霉素含量测定与分析[J]. 蚕业科学, 2007, 33(4): 637-641.

[5] 梁建宁,陈正收,吴璐,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定桑白皮中1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 905-907.

[6] 陈正收,徐瑾,周亚军. 桑白皮药材中1-脱氧野尻霉素的两种含量测定方法的比较[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1657.

[7] 耿鹏,朱元元,杨洋,等. 桑树资源中1-脱氧野尻霉素的测定及其生物活性分析[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1151-1154.

[8] 周光雄,阮杰武,黄关燕,等. 蚕沙中生物碱成分研究[J]. 中药材, 2007, 30(11): 1384-1385.

[责任编辑 顾雪竹]