

## RP-HPLC 测定蒜氨酸原料药中的有关物质

黄洪勇<sup>1</sup>, 崔利娜<sup>2</sup>, 唐辉<sup>2\*</sup>, 黄瑞廷<sup>2</sup>

(1. 新乡医学院第二附属医院, 河南 新乡 453002;

2. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源省部共建教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

**[摘要]** 目的: 建立测定蒜氨酸中试原料药中有关物质的方法。方法: 采用 RP-HPLC, DIKMA Diamonsil™ C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以水为流动相, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 220 nm。结果: 蒜氨酸与相邻杂质峰能完全分离, 蒜氨酸在 0.049 6 ~ 1.008 6 μg 进样量与峰面积呈良好线性关系 ( $r=0.999\ 6$ ), 最低检测限为 4 ng, 精密性 RSD 0.43%, 平均回收率为 99.22% ( $n=9$ )。结论: 该方法简便、准确、专属性好、灵敏度高, 可用于控制蒜氨酸中试原料药的质量。

**[关键词]** 蒜氨酸; 有关物质; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0101-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013120101

## Determination of the Related Substance in Alliin by RP-HPLC

HUANG Hong-yong<sup>1</sup>, CUI Li-na<sup>2</sup>, TANG Hui<sup>2\*</sup>, HUANG Rui-ting

(1. The Second Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453002, China; 2. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources, College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method to determine the related substances of alliin. **Method:** RP-HPLC was adopted for the determination of the related substances of alliin. The chromatographic procedure was carried out with DIKMA Diamonsil™ C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) as an analytical column and water as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup> at 25 °C. The detection wavelength was set at 220 nm. **Result:** There was a good linear relationship within the ranger of 0.049 6-1.008 6 μg ( $r=0.999\ 6$ ), the limit of detection for alliin was 4 ng. The precision was 0.43%, the average recovery was 99.22% ( $n=9$ ). **Conclusion:** The method is simple, accurate, specific and sensitiveness for quality control of alliin.

**[Key words]** alliin; related substances; HPLC

蒜氨酸 (alliin, 分子式 C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>S, 相对分子质量 177.22) 化学名为 *S*-烯丙基-*L*-半胱氨酸亚砷 (*S*-allyl-*L*-cysteine sulfoxide, SACS), 纯品为无嗅无味, 性质稳定的白色结晶。现代研究表明, 蒜氨酸具

有抑制肿瘤、保护心血管、提高免疫力、清除自由基等多种重要的保健功能<sup>[1-4]</sup>。

Alliin 原料药生产工艺复杂, 是经过一系列提取后用阳离子交换树脂吸附浓缩、氨水解吸、结晶得到的。在结晶的过程中, 与 alliin 性质相近的有关物质也会被结晶出来。对有关物质进行测定, 不仅可以完善质量标准, 而且为明确其有效性和安全性提供了重要依据<sup>[5]</sup>。目前, 国内未见关于 alliin 中试原料药有关物质测定方法的报道。作者参考有关文献<sup>[6-7]</sup>, 选择检测波长 220 nm, 建立了反相高效液相色谱法测定 alliin 原料药中的有关物质, 为进一步制订 alliin 原料药的质量标准、全面监控后续制剂的质量提供参考。

**[收稿日期]** 20120819(009)

**[基金项目]** 新疆维吾尔自治区高新技术研究与发展计划项目 (200511112)

**[第一作者]** 黄洪勇, 硕士, 执业药师, 从事药物分析研究, Tel: 0373-3373956, E-mail: hzhao2002@126.com

**[通讯作者]** \*唐辉, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 0993-2057162, E-mail: Th\_pha@shzu.edu.cn

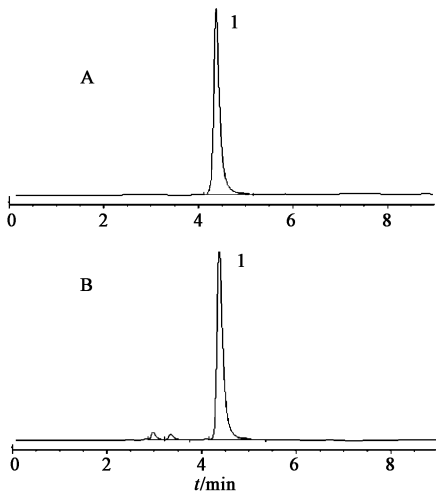
## 1 材料

美国 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪, 德国 Sartorius BP211D 型电子天平, TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。蒜氨酸对照品(制备液相自制, 经紫外光谱、红外光谱、核磁及质谱确认结构, 含量 99.9%, 批号 060618); 3 批蒜氨酸供试品(中试自制原料药, 批号 061019, 071003, 071217), 其他试剂均为分析纯, 试液均按《中国药典》(2010 年版)二部附录 XV B 配制。

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

DIKMA Diamonsil™ C<sub>18</sub> 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 100% 水, 用前经过滤脱气, 流速 0.8 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 220 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。Alliin 的保留时间约为 4.9 min, 理论塔板数 > 10 000。对称因子为 1.05, 与其他有关物质色谱峰的分离度 > 1.5。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 蒜氨酸

图 1 蒜氨酸原料药高效液相色谱

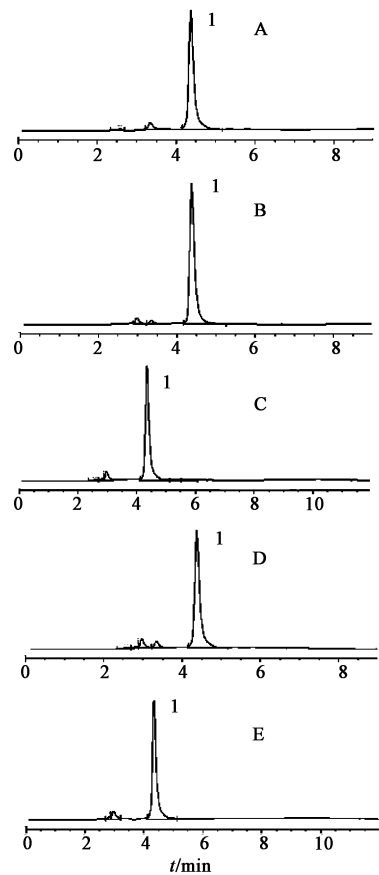
### 2.2 破坏性试验

#### 2.2.1 热破坏试验

取蒜氨酸供试品 5 mg, 精密称定, 置干燥坩埚中炒至微黄色, 流动相分次溶解转移至 25 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 取适量 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 6 min, 20 μL 满环进样, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图(图 2-A)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

#### 2.2.2 酸热破坏试验

取蒜氨酸供试品 5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸 5 mL, 水浴加热 15 min, 取出放冷, 再用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 至中性, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 取适量 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 6 min, 20 μL 满环进样, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图(图 2-



A. 热破坏; B. 酸热破坏; C. 碱热破坏;  
D. 光破坏; E. 氧化破坏; 1. 蒜氨酸

图 2 蒜氨酸原料药专属性考察的 HPLC

B)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

#### 2.2.3 碱热破坏试验

取蒜氨酸供试品 5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 5 mL, 水浴加热 15 min, 取出放冷, 再用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸调 pH 至中性, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 取适量 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 6 min, 20 μL 满环进样, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图(图 2-C)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

#### 2.2.4 光破坏试验

取蒜氨酸供试品 5 mg, 精密称定, 置培养皿中, 于 4 500 Lx 强光照射 24 h 后, 置 25 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取适量 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 6 min, 20 μL 满环进样, 按上述色谱条件依法测定, 记录色谱图(图 2-D)。由图可见, 供试品与其降解产物能很好地分离。

#### 2.2.5 氧化破坏试验

取蒜氨酸供试品 5 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 滴加 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 过氧化氢溶液 5 mL, 水浴加热 15 min, 取出放冷, 用流动相

稀释至刻度,摇匀,取适量  $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,  $20\ \mu\text{L}$  满环进样,按上述色谱条件依法测定,记录色谱图(图 3-E)。由图可见,供试品与其降解产物能很好地分离。

**2.3 测定方法** 取蒜氨酸供试品 5 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取蒜氨酸对照品 5 mg,精密称定,同法配制对照品溶液。

分别取供试品溶液和对照品溶液适量,  $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,  $20\ \mu\text{L}$  满环进样,记录色谱图。计算蒜氨酸的含量。

**2.4 线性关系考察** 精密量取蒜氨酸对照品溶液适量,配成系列对照品溶液,分别进样,记录峰面积值。以蒜氨酸的进样量( $\mu\text{g}$ )对峰面积进行线性回归,得回归方程  $Y = 6\ 852.7X + 6.579\ 2$  ( $r = 0.999\ 6$ )。结果表明蒜氨酸进样量在  $0.049\ 6 \sim 1.008\ 6\ \mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.5 最低检测限** 在选定的色谱条件下,按信噪比为 3 对最低检测限进行测定,结果表明蒜氨酸的最低检测限为 4 ng。

**2.6 精密度试验** 精密量取蒜氨酸对照品溶液 ( $0.124\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $20\ \mu\text{L}$ ,6 次连续进样,结果蒜氨酸峰面积 RSD 0.43%,说明该仪器精密度良好。

**2.7 重复性试验** 测定 6 份蒜氨酸供试品 (071003) 溶液,其含量变化的 RSD  $< 2.00\%$ ,说明本方法重复性良好。

**2.8 稳定性试验** 分别于 0,1,2,3,4,5,6 d 取供试品溶液适量,  $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,  $20\ \mu\text{L}$  满环进样,按上述色谱条件依法测定。结果峰面积的 RSD 0.98%,表明供试品溶液在 6 d 内稳定。

**2.9 回收率试验** 取蒜氨酸对照品适量,精密称定,置 50 mL 量瓶中,流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取供试品溶液 1.0 mL 置于 9 支 25 mL 量瓶中,按高中低 3 个浓度分别加入对照品溶液 2.0,3.0,4.0 mL,每个浓度平行 3 份,流动相稀释至刻度。测得平均回收率为 99.22%, RSD 1.64% ( $n = 9$ )。见表 1。

**2.10 样品含量测定** 取 3 批蒜氨酸供试品,按 2.3 项下制备,2.1 项下测定,记录色谱图,结果见表 2。

由表 2 可见,原料药含量测定 RSD 较小,说明该测定方法比较可靠。不同批次的蒜氨酸原料药含量不同,061019 号样品是在实验室中经过重结晶得到的,其他样品是经过一次结晶得到的粉末。由此

表 1 蒜氨酸加样回收率试验

No.	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.496	0.328	0.834	102.02		
1	0.496	0.328	0.816	98.39		
1	0.496	0.328	0.831	101.41		
2	0.496	0.492	0.980	98.39		
2	0.496	0.492	0.981	98.59	99.22	1.64
2	0.496	0.492	0.990	100.40		
3	0.496	0.656	1.142	97.98		
3	0.496	0.656	1.143	98.19		
3	0.496	0.656	1.140	97.58		

表 2 不同批次蒜氨酸原料药含量测定 ( $n = 3$ )

批号	蒜氨酸含量/%	RSD/%
061019	92.26	2.48
071003	83.92	1.56
071217	81.76	1.81

可以看出,结晶次数对原料药的纯度有较大影响,重结晶可以很好的提高原料药中蒜氨酸的含量。

**2.11 有关物质测定** 采用不加校正因子的主成分自身对照法测定有关物质含量<sup>[8]</sup>。精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。取对照溶液适量,  $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 6 min,  $20\ \mu\text{L}$  满环进样,调节检测灵敏度,使主成分峰高为满量程的 30%;再取供试品溶液  $20\ \mu\text{L}$  满环进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍,用峰面积归一化法计算有关物质的含量。采用自身对照法,计算 3 批供试品有关物质峰面积总和分别为 7.16%,15.46%,18.05%。

### 3 讨论

通过对蒜氨酸的最大吸收波长的考察,发现蒜氨酸在水溶液中其最大吸收波长在 220 nm 处,但在甲醇、酸、碱溶液中,其最大吸收波长小于 220 nm,均属于末端吸收,这与其结构中无发色基团和共轭结构相一致。因此,本文将检测波长定在 220 nm 处。

在各种破坏条件的预实验中发现,碱破坏图谱约 5.8 min 还有杂质峰出现,为全面考察有关物质的出峰时间将色谱图记录时间延长至主峰保留时间的 2 倍以上。蒜氨酸供试品经破坏产生的杂质有待进一步研究,以全面考察储存环境对蒜氨酸的影响。

现行的中药药品注册法规<sup>[9-10]</sup>在中药有效性方面非常重视,对相关技术要求进行了更加科学、合理和适当的提高。原料药中有关物质会对药物的有效

# HPLC 测定异黑成熟颗粒中田蓟苷和甘草酸的含量

薛桂蓬<sup>1\*</sup>, 邢建国<sup>1</sup>, 马建红<sup>1</sup>, 刘桂花<sup>1</sup>, 阿不都热依木·玉素甫<sup>2</sup>

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;  
2. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的: 建立测定异黑成熟颗粒中 2 种有效成分田蓟苷和甘草酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.5% 甲酸 (27:73) 为流动相, 检测波长 324 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.2 mol·L<sup>-1</sup> 酸铵-冰醋酸 (67:33:1) 为流动相, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果: 田蓟苷和甘草酸分别在 1.14 ~ 114 μg ( $r=0.9999$ ) 和 20.6 ~ 206 μg ( $r=0.9997$ ) 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.26% (RSD 2.29%), 99.39% (RSD 1.86%)。结论: 该方法简便可行, 重复性好, 可用于异黑成熟颗粒中田蓟苷和甘草酸含量测定。

**[关键词]** 异黑成熟颗粒; 田蓟苷; 甘草酸; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0104-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013120104

**[收稿日期]** 20120629(007)

**[基金项目]** 新疆自治区科技攻关和重点计划项目(200733146-4)

**[通讯作者]** \* 薛桂蓬, 助理研究员, 从事中药新型给药系统与中药新药研究, Tel: 13999160606, 0991-2318172, E-mail: 667889116\_xue@163.com

性产生较大影响, 因此, 有必要进行有关物质检查。

在研究原料药有关物质测定方法时, 因供试品中大多数有关物质不很明确, 故采用高效液相色谱的高低自身对照法来进行。蒜氨酸原料药是在中试车间制备所得, 在中试生产过程中, 可能会产生一系列的有关物质, 从而影响到原料药的稳定性。本文通过摸索条件, 建立了反相高效液相色谱法测定蒜氨酸原料药中的有关物质, 方法专属性强、简便、快速, 结果准确可靠。

## [参考文献]

[1] Li W H, Wang D X, Song G H, et al. The effect of combination therapy of alliin and fenofibrate on high fat diet-induced vascular endothelium dysfunction and liver damage in rats [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2010, 9(1):131.

[2] Khodavandi A, Alizadeh F, Aala F, et al. *In vitro* investigation of antifungal activity of alliin alone and in combination with azoles against candida species [J]. *Mycopathologia*, 2010, 169(4):287.

[3] 黄洪勇, 崔利娜, 唐辉, 等. 蒜氨酸原料药的质量控制标准研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(5):363.

[4] Yang L J, Fan L, Liu Z Q, et al. Effects of alliin on CYP2C19 and CYP3A4 activity in healthy volunteers with different CYP2C19 genotypes [J]. *Eur J Clin Pharm*, 2009, 65(6):601.

[5] 孙熠, 耿婷, 单鸣秋, 等. HPLC 测定荆芥内酯的含量和有关物质 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5):52.

[6] 黄洪勇, 崔利娜, 唐辉, 等. 蒜氨酸原料药的理化性质和稳定性研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(4):879.

[7] Arnaut I, Christides J P, Mandon N, et al. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, alliin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection [J]. *J Chromatography A*, 2003, 991(1):69.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010; 附录 VID.

[9] 国家食品药品监督管理局. 药品注册管理办法 [S]. 局令第 28 号. 2007-07-10.

[10] 国家食品药品监督管理局. 中药注册管理补充规定 [S]. 2008-01-07.

[责任编辑 顾雪竹]