

痰热清注射液固形物中焦谷氨酸组分的 RP-HPLC 法测定^{*}

杨清林, 傅 亚

(重庆科技学院 化学化工学院, 重庆 401331)

摘要:对痰热清注射液固形物中焦谷氨酸(P-Glu)的组分含量进行分析,通过对比 P-Glu 标准物质,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)对不同批次的痰热清注射液的固形物进行测定,确定不同批次痰热清注射液中 P-Glu 含量。研究中所用色谱柱为 Sionchrom ODS-BP(200 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈和 3.5 mmol/L 磷酸二氢钠缓冲液(两者体积比为 1:99),流速为 1.0 mL/min,检测波长 205 nm,柱温 27 ℃。结果发现,不同批次痰热清注射液中 P-Glu 含量范围为 0.5%~1.2%,平均含量近 0.86%,故不同批次药品中 P-Glu 含量有一定差异。该方法能快速、有效地分析测定痰热清注射液固形物中 P-Glu 含量,对该注射液的质量控制有着重要意义。

关键词:痰热清注射液;固形物;焦谷氨酸;反相高效液相色谱

中图分类号:Q503;R927.2

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2012)05-0067-04

痰热清注射液是临床应用较多的一种清热、化痰、解毒的中药制剂,为棕红色澄明液体,主要成分为黄芩、熊胆粉、山羊角提取物、金银花和连翘。该药主要用于治疗上呼吸道感染^[1]、急性支气管炎、慢性支气管炎急性发作^[2]、肺炎早期^[3]以及流行性腮腺炎^[4]、流行性乙型脑炎^[5]、急性胆囊炎^[6]、急性胰腺炎^[7]等疾病。该中药注射液以黄芩为君药,上行清肺火,下行泻膀胱火,是常见的清热药物;山羊角和熊胆粉为臣药,熊胆粉具有解痉、解毒、抑菌抗炎、镇咳、祛痰平喘等作用;金银花和连翘为佐药以助清热解毒、清热宣透等^[8]。山羊角的功用与羚羊角相近,姜清华等人的研究认为山羊角具有替代羚羊角的可行性^[9]。山羊角中主要水解成分为氨基酸,具有抗病毒、增强机体免疫、解热、镇静、解痉等作用^[10],对心血管、中枢神经及平滑肌等有作用,临床上有退热、降压、治疗头痛等作用^[11]。山羊角的水解液中存在 16 种氨基酸,其中复合氨基酸起主要药理作用,王伯初等^[12]对山羊角提取物的物质基础进行了研究,发现山羊角提取物中存在较高含量的焦谷氨酸(P-Glu),P-Glu 存在于体内多种组织,P-Glu 和谷氨酸(Glu)在一定条件下可相互转化,在山羊角

提取物中为首次发现,故 P-Glu 的分析检测十分重要。目前一般测定 P-Glu 的方法是使脱水环化的 P-Glu 在一定的条件下开环重新生成 Glu,通过测量 Glu 的含量变化来折算 P-Glu 的最终含量。高效液相色谱法(HPLC)测定 P-Glu 含量有一些报道,如郝小燕^[13]等对天麻中 P-Glu 的含量进行研究,秦波^[14]等测定了不同品类人参及红参不同部位 P-Glu 的含量,陆明^[15]等测定了复方氨基酸中 P-Glu 的含量。本研究采用更适用于氨基酸等小分子物质含量分析的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)法^[16-19],对不同生产批次的痰热清注射液制剂固形物中的重要氨基酸组分 P-Glu 含量进行了研究,获得了良好的分析结果,对痰热清注射液的质量控制和标准提升具有重要参考价值。

1 方法

1.1 仪器和材料

研究所用主要仪器和材料为:高效液相色谱(大连伊利特公司生产的 EC2006 色谱工作站,含 P230 II 高压恒流泵、UV230 II 紫外-可见检测器和 ZWII 色谱柱温箱);Elit Sionchrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm×

^{*} 收稿日期:2012-04-18 修回日期:2012-06-20 网络出版时间:2012-9-15 23:19

作者简介:杨清林,男,讲师,硕士,研究方向为药物分析、药物化学教学。

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120915.2319.201205.67_016.html

200 mm, 粒度 5 μm); 自动双重纯水整流器(SZ-93 型, 上海亚荣公司生产); 精密电子天平(FA2004 型, 上海恒平公司生产); 0.22 mm $\times$ 25 mm 微孔滤膜(德国 MEMBRANA 公司生产); 一次性 1 mL 无菌注射器(上海治宇公司生产); P-Glu 标准品(纯度不低于 98%, Alfa aesar 公司生产); 痰热清注射液(上海凯宝药业生产的 091111 批、091118 批、091125 批、091201 批和 091204 批); 色谱纯乙腈、分析纯磷酸和分析纯磷酸氢二钠(成都科龙化工试剂厂生产)。

1.2 溶液配制

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称取 P-Glu 对照品 13.6 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加色谱用流动相溶解并定容至刻度, 摇匀。取配好的 P-Glu 溶液 1 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 用色谱用流动相定容至刻度, 摇匀。以此浓度为最高浓度, 依次等倍稀释 5 次, 依次编号 1、2、3、4、5 号; 通过稀释后得到的溶液浓度依次为: 136、68、34、17 和 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.2 供试品溶液的配制 将 5 批痰热清注射液冻干后准确称量, 冻干后各批次痰热清注射液的重量分别为 14.5 (091111 批)、19.5 (091118 批)、16.3 (091125 批)、14.6 (091201 批) 和 14.3 mg (091204 批)。然后将冻干物分别置于 10 mL 容量瓶中, 用色谱用流动相溶解并定容至刻度, 摇匀。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Elit Sinochrom ODS-BP 色谱柱; 流动相为乙腈和 3.5 mmol 磷酸氢二钠缓冲液(两者体积比为 1:99), 用 20% 的磷酸调节 pH 值至 3, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 超声脱气 20 min。检测波长为 205 nm, 柱温为 27 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 20 μL 。

2 结果

2.1 P-Glu 线性方程及线性范围

对 5 种不同浓度 P-Glu 对照品测定结果所得积分数据进行分析, 得到 P-Glu 的线性方程及线性范围。P-Glu 质量浓度在 8.5~136 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性良好, 线性方程为 $C=0.0671A-3.2621$ ($R^2=0.9988$), 其中 A 为峰面积, C 为质量浓度。

2.2 P-Glu 分析的精密度和准确度

取同一批次供试品溶液进行测定, 重复 6 次, 测

定 P-Glu 的峰面积及其保留时间, 并分别计算相对标准偏差(RSD)。测定结果显示峰面积和保留时间重复性的 RSD 值分别为 0.92% 和 0.58% ($n=6$), 表明精密度良好(表 1)。精确吸取 P-Glu 含量为 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液 1、1.5 和 2 mL 置于 10 mL 的容量瓶中, 用已知 P-Glu 质量浓度的同批次供试品溶液分别定容至刻度, 各平行做 3 份, 然后进行测定, 计算 P-Glu 的回收率及平均回收率, 并计算 RSD 值。测定结果显示平均回收率分别为 100.13%、99.41% 和 99.96%, RSD 值分别为 0.17%、0.60% 和 0.48%(表 2)。

表 1 P-Glu 重复性试验峰面积、保留时间及 RSD 值

	序号						RSD /%
	1	2	3	4	5	6	
峰面积 /(mV $\cdot$ min)	256.14	254.11	257.15	251.77	258.44	255.11	0.92
保留时间 /min	5.01	5.08	5.07	5.04	5.04	5.01	0.58

表 2 加标回收率试验结果

批 次	P-Glu			回收率 /%	平均回 收率/%	RSD/ %
	加供试品 量/ μg	加标量 / μg	检出量 / μg			
1	12.53	8.50	21.03	100.02		
	12.53	8.50	21.03	100.06	100.13	0.17
	12.53	8.50	21.05	100.31		
2	11.83	12.75	24.59	100.06		
	11.83	12.75	24.49	99.28	99.41	0.60
	11.83	12.75	24.44	98.89		
3	11.14	17.00	28.20	100.38		
	11.14	17.00	28.15	100.08	99.96	0.48
	11.14	17.00	28.04	99.44		

2.3 痰热清注射液中 P-Glu 含量测定

测定各批样品中 P-Glu 含量, 测定结果色谱图如图 1 所示。各批样品 P-Glu 含量经计算分别为 0.96% (091111 批)、1.18% (091118 批)、0.81% (091125 批)、0.54% (091201 批)、0.79% (091204 批)。

3 讨论与结论

3.1 色谱柱的选择

研究前对 CAPCELL PAK C_{18} SG300 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 粒度 5 μm)、LiChrospher 100 NH_2 (250 mm $\times$

4.6 mm,粒度 5 μm)和 sionchrom ODS-BP(200 mm $\times$ 4.6 mm,粒度 5 μm)多种色谱柱进行考察后发现,NH₂柱由于痰热清固形物中物质成分较复杂,P-Glu 的分离度无法达到要求;C₁₈柱对 P-Glu 无保留,无法进行有效

的检测;而 ODS 柱剂型相对较小,对 P-Glu 有较好的分离,且预实验中 P-Glu 的峰型也相对较好。因此最后采用 ODS 柱作为分离的色谱柱。

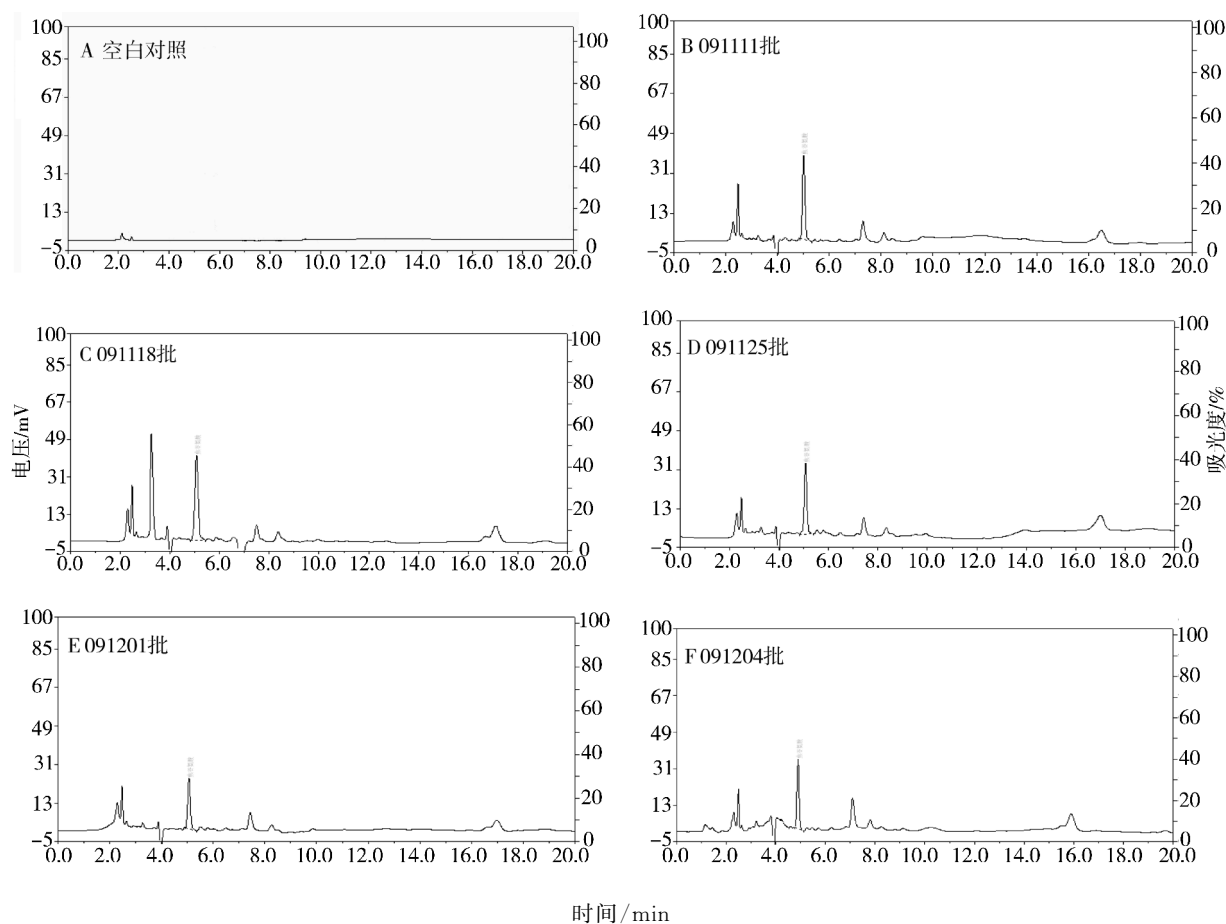


图1 痰热清注射液固形物中 P-Glu 的 HPLC 测定色谱

3.2 小结

根据近年对 P-Glu 的药理研究证实,P-Glu 具备抗惊厥、抗焦虑及对 Glu 等受体的阻断作用,上述 P-Glu 的活性作用与传统中药中对山羊角的使用有某些吻合。本研究也发现了 P-Glu 大量存在于山羊角提取物中,对痰热清注射液中 P-Glu 的含量进行 RP-HPLC 测定发现,不同批次痰热清注射液中 P-Glu 含量范围为 0.5%~1.2%左右,平均含量近 0.86%,是痰热清固形物中的一个重要组分。该结果对痰热清注射液固形物中 P-Glu 含量的准确测定以及该注射液的标准提升质量控制有着重要参考价值。

参考文献:

[1] 亓民,孟玉娟.痰热清治疗成人上呼吸道感染 120 例临床观察[J].河南科技大学学报,2005,23(3):1-3.

- [2] 李永胜.痰热清注射液雾化吸入治疗肺炎的临床观察[J].中国医学理论与实践,2005,15(8):1235-1236.
- [3] 韩应前,张容霞.痰热清治疗急性支气管炎 78 例临床观察[J].实用医技杂志,2005,12(8):2106-2107.
- [4] 王银山.痰热清注射液治疗流行性乙型脑炎 23 例疗效观察[J].河南中医,2005,25(8):74.
- [5] 冯念东.痰热清注射液治疗亚急性甲状腺炎 18 例疗效观察[J].中华医学实践杂志,2005,4(7):690.
- [6] 田莉.痰热清治疗急性胆囊炎 60 例[J].第四军医大学学报,2005,26(6):496.
- [7] 陈怡发.痰热清注射液治疗急性胰腺炎的疗效观察[J].中原医刊,2005,32(14):53.
- [8] 刘万平.痰热清治疗耕牛外感发热的临床观察[J].中国兽医杂志,2007,43(6):41.
- [9] 姜清华,翟延君.羚羊角与山羊角药理作用比较[J].山西医药杂志,2006,35(7):582-583.

- [10] 孙宝森. 动物角类的药用研究概况[J]. 中医药信息, 2004, 21(3): 25-26.
- [11] 刘力, 张辉, 胡嵘, 等. 山羊角研究概述[J]. 长春中医药大学学报, 1994, 10(5): 109.
- [12] 李江海, 王伯初, 王建, 等. 山羊角提取物中焦谷氨酸含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1567.
- [13] 郝小燕, 谭宁华. 高效液相色谱法测定天麻中 L-焦谷氨酸的含量[J]. 中草药, 2000, 31(2): 94.
- [14] 秦波, 李向高, 郑毅男. 用高效液相色谱法测定不同品类人参及红参不同部位焦谷氨酸的含量[J]. 中草药, 1994, 25(2): 75.
- [15] 陆明, 汪杨, 孙黛妮, 等. 高效液相色谱法测定复方氨基酸(15)双肽(2)注射液中 2 种杂质的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5): 868.
- [16] 陈武罗, 志刚, 邹盛勤, 等. 黄毛耳草中乌索酸的分离提纯及 RP-HPLC 分析[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2005, 29(4): 348-350.
- [17] 严军, 张志远, 刘绍璞. 反相高效液相色谱法分离测定 5 种黄酮类化合物[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(3): 41-44.
- [18] 范开, 马雪丰, 谢敏, 等. RP-HPLC 法测定血浆中聚乙二醇尿酸酶浓度的方法[J]. 重庆理工大学学报: 自然科学版, 2010, 24(5): 29-32.
- [19] 李厚聪, 刘圆, 袁玮, 等. RP-HPLC 法测定薏苡中薏苡素的含量[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(11): 154-157.

Determination of P-Glu Content in Solid Substance of Tanreqing Injection by RP-HPLC

YANG Qing-lin, FU Ya

(Chemistry and Chemical of Engineering College, Chongqing University of Science & Technology, Chongqing 401331, China)

Abstract: The content of P-Glu in solid substance in Tanreqing injection dose was analyzed. The content of P-Glu in solid substance in Tanreqing by RP-HPLC was determined, and defined the content of P-Glu in the solid substance of different batches Tanreqing by comparing with reference of P-Glu. In this study the Chromatographic conditions was Sionchrom ODS-BP(200 mm×4.6 mm, 5 μm) column, acetonitrile—3.5 mmol/L phosphate buffer(volume ratio 1:99) with pH 3 as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was set at 205 nm, the temperature of column was set at 27 °C. The results showed that the Content of P-Glu in different batches were determined in the range of 0.5 %~1.2 %, the average value was 0.86 %, it was indicated that the content of P-Glu in Tanreqing injection dose differs slightly in different batches. The method established in the paper was effective and stable, which is quite important to the quality control of Tanyeqing injection dose.

Key words: Tanreqing injection dose; solid substance; P-Glu; RP-HPLC

(责任编辑 方 兴)