

· 制剂与质量 ·

HPLC 法测定 23-羟基白桦酸注射液中 23-羟基白桦酸的含量

杨 敏^{1,2}, 王广基¹, 叶文才¹, 周杏琴², 潘尚仁², 项景德^{2*}

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省原子医学研究所 核医学国家重点实验室, 江苏 无锡 214063)

摘 要: 目的 建立 23-羟基白桦酸注射液中 23-羟基白桦酸的 HPLC 分析方法。方法 采用 HPLC 法。色谱柱: YW G C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 10 μm); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸 (600:400:1); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 205 nm; 柱温: 25 °C; 检测灵敏度: 0.005 AUFS。采用外标法测定 23-羟基白桦酸的量。结果 23-羟基白桦酸在 10~100 μg 与峰面积具有良好线性关系, 平均回收率为 99.54%, RSD 为 1.98% (n=5)。结论 该方法快速、简便、准确可靠, 可用于 23-羟基白桦酸的定量。

关键词: 23-羟基白桦酸注射液; 23-羟基白桦酸; 高效液相色谱

中图分类号: R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2004)11-1228-02

Determination of 23-hydroxybetulinic acid in 23-Hydroxybetulinic Acid Injection by HPLC

YANG Min^{1,2}, WANG Guang-ji¹, YE Wen-cai¹, ZHOU Xing-qin², PAN Shang-ren², XIANG Jing-de²

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, State Key Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

Abstract: **Object** To establish a HPLC method for determination of 23-hydroxybetulinic acid (23-HBA) content in 23-Hydroxybetulinic Acid Injection (23-HBA I). **Methods** HPLC method was used with C₁₈ reverse phase column (250 mm × 4.6 mm, 10 μm), acetonitrile-water-acetic acid (600:400:1) as mobile phase, velocity 1.0 mL/min, column temperature at 25 °C, sensitivity 0.005 AUFS, detecting wave at 205 nm. Content of 23-HBA in 23-HBA I was determined with external standard method. **Results** The standard curves of 23-HBA showed good linearity over the range of 10—100 μg and the average recovery was 99.54% with RSD 1.98% (n=5). **Conclusion** The method is quick and simple, and it is accurate and reliable for the determination of 23-HBA.

Key words: 23-Hydroxybetulinic Acid Injection (23-HBA I); 23-hydroxybetulinic acid (23-HBA); HPLC

白头翁具清热解毒、活血化瘀之功效, 中医临床主要用于结肠癌、直肠癌等肠道肿瘤及子宫颈癌、脑垂体瘤、甲状腺瘤、肺癌的治疗。白头翁在我国广泛分布, 作为临床常用的传统中药材, 每年国内外市场需求量可达数千吨。23-羟基白桦酸 (23-HBA) 是从白头翁根部首先分离出的一种五环三萜类皂苷, 无毒。体内外抑瘤实验表明, 其较白头翁中提取的其他衍生物抗黑色素瘤作用强^[1], 低剂量 (10~20 μg/mL) 时对黑色素瘤 B16 细胞即有明显的分化诱导作用^[2], 高剂量 (小鼠灌胃 300~600 mg/kg) 时诱导肿瘤细胞凋亡, 对体内外黑色素瘤增殖有明显的抑制作用^[3]。此外, 其不同于白桦酸只对黑色素瘤有抑制作用而对其他肿瘤细胞没有作用^[4]。对多种肿瘤

细胞系如人胃癌 SGC-7901 细胞系、人卵巢癌 A0 细胞系、人白血病 HL-60 细胞系、人白血病 K562 细胞系、人宫颈癌 Hela 细胞系及小鼠腹水瘤 S₁₈₀ 细胞系等均有抑制作用^[5]。23-HBA 可阻止人白血病 HL-60 细胞生长, bcl-2 及端粒酶活性同时下调导致细胞凋亡^[6]。因其广泛的抗肿瘤活性, 具有较好的开发价值, 是一很好的广谱抗肿瘤药物。本实验建立了 23-HBA 的 HPLC 测定法, 为制定 23-HBA 的质量标准、进行 23-HBA 的药动学研究等提供了一个简便、可靠的检测手段。

1 仪器与药品

BS-110S 型电子天平 (Sartorius); BD-RAD MODEL 2800 高效液相色谱系统; BD-RAD BD-

* 收稿日期: 2004-03-18

基金项目: 教育部优秀青年教师资助 (教人司 [2002]350 号); 人事部回国人员择优项目资助 (2002-AK-0256); 广东省关键领域重大突破项目 (2003A 30909)

作者简介: 杨 敏 (1972—), 女, 江苏靖江人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事放射性药物开发及放射性核素示踪法药动学研究。
Tel: (0510) 5514482-3523

D M E N S D NTM 紫外检测器, B D - R A D 泵, B D - R A D M O D E L A S - 100 T H P L CTM 自动进样器。

23-HBA 对照品(纯度> 98%)由中国药科大学天然药化教研室提供; 23-HBA 注射液(批号: 031223、040106、040301)由江苏省原子医学研究所提供; 乙腈为色谱纯试剂, 二氯甲烷、二甲亚砜和冰醋酸为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备: 精密称取 23-HBA 对照品 25 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声使溶解并加至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液(质量浓度为 5 mg/mL)。

2.2 空白对照溶液的制备: 取 0.2 mL 二甲亚砜, 加 0.2 mL 聚山梨酯-80、1.0 mL 生理盐水, 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件: 色谱柱: YW G C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 10 μ m) (大连依利特公司); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸(600 400 1); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 205 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测灵敏度: 0.005 AUFS。在上述色谱条件下, 23-HBA 的保留时间为 13.9 min 左右, 柱效以 23-HBA 计算, 理论塔板数大于 10 000。色谱图见图 1。

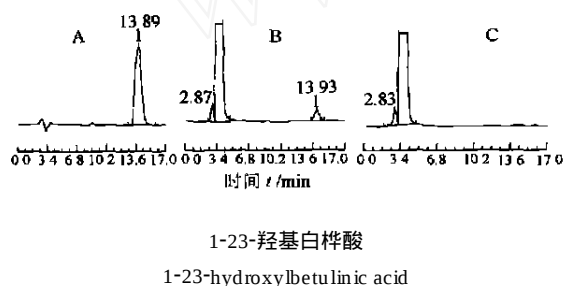


图 1 对照品(A)、23-羟基白桦酸注射液(B)和空白对照(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), 23-HBA I (B), and blank (C)

2.4 线性关系考察: 将 23-HBA 对照品储备溶液加甲醇分别配成 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0 mg/mL 的对照品溶液, 经微孔滤膜(0.45 μ m)滤过, 在上述色谱条件下, 进样 20 μ L, 记录色谱图。进样量(X)对峰面积(Y)的回归方程为: $Y = 510\,704 X - 631\,997$, $r = 0.999\,1$, 线性范围为 10~100 μ g。

2.5 精密度试验: 精密吸取同一对照品溶液, 重复进样 5 次, 每次 20 μ L, 以 23-HBA 的峰面积计, RSD 为 1.31%。

2.6 重现性试验: 取同一批号(批号: 040301)样品

5 份, 按上述色谱条件进样 20 μ L 测定, 23-HBA 质量分数的 RSD 为 1.76%。

2.7 稳定性试验: 取 23-HBA 注射液(批号: 040301)每隔 24 h 进样 1 次, 测定峰面积共 4 次, 以 23-HBA 峰面积计算 RSD 为 1.11%。

2.8 加样回收率试验: 取已知含量的 23-HBA I 1 mL (含 23-HBA 约 2 mg), 精密加入 2.0 mg/mL 23-HBA 对照品溶液 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 按上述方法测定, 结果 23-HBA 的平均回收率为 99.54%, RSD 为 1.98% ($n = 5$)。

2.9 样品测定: 精密吸取经微孔滤膜(0.45 μ m)滤过后的样品溶液 20 μ L, 在上述色谱条件下进样分析, 以外标法计算样品中 23-HBA 的含量, 结果见表 1。

表 1 样品中 23-羟基白桦酸的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of 23-HBA in samples ($n = 3$)

批 号	23-羟基白桦酸/(mg $\cdot$ mL ⁻¹)	RSD/%
031223	1.94	0.31
040106	1.93	0.33
040301	1.93	0.34

3 讨论

用不同比例的乙腈和水作流动相时, 23-HBA 无紫外吸收峰; 加入适量的冰醋酸后可改善, 最后确定乙腈-水-冰醋酸的最佳配比为 600 400 1。在此色谱条件下, 溶剂峰对 23-HBA 无影响, 分离度好。

因 23-HBA 不溶于水, 在制备注射液时加入适量的表面活性剂如聚山梨酯-80 以助溶, 辅料对 23-HBA 的测定无干扰。

References

- [1] Ye Y Y, He D W, Ye W C, et al. Differentiation of B16 melanoma cells induced by 23-hydroxylinic acid [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2001, 22 (4): 163-166.
- [2] Ye Y Y, He D W, Ye W C, et al. The study of 23-hydroxyl betulinic acid against melanoma *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin J Clin Oncol Rehabil* (中国肿瘤临床与康复), 2000, 7 (1): 5-7.
- [3] Ye Y Y, He D W, Ye W C, et al. Induction of apoptosis melanoma cell lines with betulinic acid and derivatives [J]. *J Southeast Univ — Med Sci Ed* (东南大学学报·医学版), 2002, 21 (13): 203-212.
- [4] Pisha E, Chai H, Lee I, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that function by induction of apoptosis [J]. *Nat Med*, 1995, 1: 1046-1051.
- [5] Ye Y Y, He D W, Ye W C, et al. The anticancer effect of 23-hydroxyl betulinic acid *in vitro* [J]. *J Southeast Univ — Med Sci Ed* (东南大学学报·医学版), 2001, 20 (13): 141-144.
- [6] Ji Z N, Ye W C, Liu G G, et al. 23-Hydroxybetulinic acid-mediated apoptosis is accompanied by decrease in bcl-2 expression and telomerase activity in HL-60 cells [J]. *Life Sci*, 2002, 72: 1-9.