

HPLC 法测定肿节风注射液中反丁烯二酸和异嗪皮啶的含量

王钢力,姚令文,林瑞超

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

肿节风为常用中药,为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全株^[1]。具有显著的抗菌、消炎、止痛及一定的肿瘤抑制作用,其主要化学成分为有机酸、倍半萜、黄酮及香豆素类化合物^[2]。肿节风注射液为肿节风药材经处理后制成的单味药注射剂,具有清热解毒、消肿散结的功效,用于热毒壅盛所致肺炎、阑尾炎、蜂窝组织炎、菌痢、脓肿,与肿节风片联合用于消化道癌、胰腺癌、肝癌等肿瘤的治疗。现行肿节风药材质量标准的含量测定项采用 HPLC 法测定异嗪皮啶(isofraxidin)的含量,而肿节风注射液则是采用 HPLC 法测定反丁烯二酸(fumaric acid)的含量,两者之间缺乏相关性,难以有效的控制药品的质量。据文献报道,反丁烯二酸具有抗菌、消炎的药理活性,而异嗪皮啶在体外活性实验中显示出一定的肿瘤细胞抑制作用^[2]。为有效控制肿节风注射液的产品质量,本实验建立 HPLC 法同时测定产品中异嗪皮啶和反丁烯二酸的含量。结果表明:该法可用于肿节风注射液的质量控制。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪系统,2996 型 DAD 紫外检测仪,Empower 色谱工作站。

肿节风注射液为深棕色,由不同生产企业提供。乙腈为色谱纯,水为市售纯净水,磷酸为分析纯,反丁烯二酸(批号:1541-200001)、异嗪皮啶(批号:0837-200203)对照品由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(150 mm×3.9 mm,5 μm);流动相:A(乙腈)-B(0.1%磷酸)梯度洗脱,0~8 min (B 为 100%),体积流量为 0.5 mL/min;8~13 min (B 为 100%→95%),体积流量为 0.5→0.7 mL/min;13~43 min (B 为 95%→80%),体积流量为 0.7 mL/min;43~48 min (B 为 80%→30%),体积流量为 0.7 mL/min;48~51 min (B 为 30%→100%),

体积流量为 0.7 mL/min;51~56 min (B 为 30%→100%),体积流量为 0.7→0.5 mL/min;柱温:38℃;检测波长:210 nm;进样量:2 μL。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取反丁烯二酸、异嗪皮啶对照品适量,加甲醇溶解,制成含反丁烯二酸 200 μg/mL、异嗪皮啶 50 μg/mL 的溶液作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取肿节风注射液样品,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察:分别精密称取反丁烯二酸、异嗪皮啶对照品适量,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成对照品溶液(含反丁烯二酸 11.66 μg/mL、异嗪皮啶 80.2 μg/mL)。精密吸取反丁烯二酸对照品溶液 1、10、20、50、100 μL,异嗪皮啶对照品溶液 0.5、1、2、4、8、12 μL,注入液相色谱仪,测定。在进样质量为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为: $Y_1 = 13\,819 X_1 + 14\,844$, $r = 1.000$; $Y_2 = 13\,961 X_2 + 143\,854$, $r = 0.999\,9$ 。表明:反丁烯二酸在 11.66~1166 ng、异嗪皮啶 40.0~962.4 ng 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验:取 20040101 批样品溶液按上述色谱条件连续进样 5 次,以峰面积计算反丁烯二酸和异嗪皮啶的 RSD 分别为 0.47% 和 0.71%。

2.6 稳定性试验:取 20040101 批样品溶液,分别在 0、1、2、4、6、24 h 测定,以峰面积计算反丁烯二酸和异嗪皮啶的 RSD 分别为 1.08% 和 0.73%。结果表明:样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取 20040101 批样品,制备供试品溶液 5 份,进样,测定,计算反丁烯二酸和异嗪皮啶的质量浓度分别为 240、64 μg/mL, RSD 分别为 3.66% 和 1.38%。

2.8 回收率试验:采用加样回收法。精密量取 1# 样品 6 份,每份 1 mL,分别置 2 mL 量瓶中,分别精密加入含反丁烯二酸和异嗪皮啶的储备液(质量浓度分别为 234、64 μg/mL) 1 mL,以甲醇溶解并稀释

至刻度,测定反丁烯二酸和异嗪皮啶的质量浓度。计算回收率分别为 97.2%和 99.3%,RSD 分别为 3.03%和 1.72%。

2.9 样品测定结果:分别精密吸取样品 2 μL 注入液相色谱仪,测定。以峰面积定量,计算反丁烯二酸及异嗪皮啶的质量浓度,结果见表 1,样品及对照品色谱图见图 1。

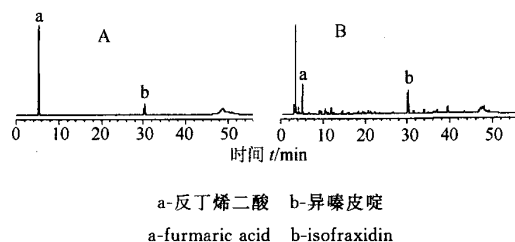


图 1 对照品(A)及 1#样品(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample No. 1 (B)

3 讨论

曾选用不同厂家或不同型号的色谱柱试验,如:Agilent Zorbax Eclipse XDB C_{18} , Agilent Zorbax SB C_{18} , Alltech Alltima C_{18} 等。结果 Agilent Zorbax Eclipse XDB C_{18} 对肿节风注射液的分离效果最好。曾选用不同溶剂系统作为流动相进行试验,如:乙腈-水,甲醇-水,乙腈-0.1%磷酸等溶剂系统。结果表明:乙腈-0.1%磷酸对肿节风注射液的分离效果最好。根据反丁烯二酸和异嗪皮啶的紫外吸收光谱特征,反丁烯二酸在 209.8 nm 处有最大吸收,异嗪皮啶在 208.6、342.6 nm 处有吸收,选择 210 nm 作为检测波长。

从样品测定结果中可以看出:不同企业使用相同产地的药材作为原料,制剂的定量指标差异较大。其中,20040401~20040407 来自同一厂家的产品中,5 批以浙江产药材为原料生产的制剂,有效成分的含量与其他批次制剂相比非常低(尤其是异嗪皮啶的量已经低于对照品工作曲线的下限)。因此,为保证制剂化学成分的稳定性,有必要对肿节风注射

表 1 样品测定结果

Table 1 Results of sample assay

序号	来源	批号	原料产地	质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
				反丁烯二酸	异嗪皮啶	可控量
1	GDBL	20040101	江西	240.0	64.00	304.0
2	GDBL	20040201	广西	140.7	181.01	321.7
3	GDBL	20040202	广西	141.6	182.23	323.9
4	GDBL	20040203	广西	142.2	182.46	324.6
5	GDBL	20040204	浙江	74.6	136.78	211.4
6	GDBL	20040205	浙江	75.3	137.17	212.4
7	GDBL	20040206	浙江	74.6	136.30	210.9
8	GXWZ	20040401	广西	28.2	78.65	106.8
9	GXWZ	20040402	广西	25.7	71.39	97.1
10	GXWZ	20040403	浙江	26.1	20.91	47.0
11	GXWZ	20040404	浙江	24.6	20.16	44.7
12	GXWZ	20040405	浙江	24.0	11.77	35.8
13	GXWZ	20040406	浙江	24.2	10.83	35.0
14	GXWZ	20040407	浙江	23.2	11.07	34.3
15	ZJGJ	20040114	江西	189.0	16.45	205.5
16	ZJGJ	20040115	江西	193.3	38.15	231.5
17	ZJGJ	20040116	江西	193.3	37.92	231.2
18	ZJGJ	20040226	广西	129.2	110.21	239.4
19	ZJGJ	20040227	广西	130.0	110.99	241.0
20	ZJGJ	20040228	广西	189.6	38.71	228.3
21	ZJGJ	20040303	浙江	103.0	64.67	167.7
22	ZJGJ	20040304	浙江	98.0	59.99	158.0
23	ZJGJ	20040305	浙江	96.2	57.99	154.1
24	JXYJ	20040401	浙江	466.8	62.63	529.4
25	JXYJ	20040402	广西	393.3	95.82	489.2
26	JXYJ	20040403	广西	158.0	39.49	197.5
27	FJGT	20040105	江西	263.4	47.10	310.5
28	FJGT	20040308	浙江	367.1	71.07	438.2
29	FJGT	20040312	广西	308.9	161.24	470.1
30	JLTH	20040301-1	江西	424.4	220.46	644.9
31	JLTH	20040301-2	江西	454.6	243.15	697.7
32	JLTH	20040302-1	浙江	429.9	265.55	695.5
33	JLTH	20040302-2	浙江	452.2	276.52	728.7
34	JLTH	20040303-1	广西	320.7	336.31	657.0
35	JLTH	20040303-2	广西	320.5	305.83	626.4

液的原料产地及制剂的工艺及其参数进行控制。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advanced in studies on chemical constituents and its quality control of *Sarcandra glabra* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2003, 34(8): a-12.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青