

HPLC法测定注射用硫酸长春新碱的含量

朱 荣*(广西食品药品检验所, 南宁 530021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0407-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.42

摘要 目的:建立测定注射用硫酸长春新碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent HC-C₈,流动相为1.67%二乙胺水溶液(用磷酸调pH至7.5)-甲醇(38:62, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为297 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μl。结果:硫酸长春新碱的检测质量浓度线性范围为0.032~3.2 mg/ml($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;平均回收率99.3%~101.7%,RSD=0.6%($n=9$)。结论:该方法准确、可靠、灵敏度高,可用于测定注射用硫酸长春新碱的含量。

关键词 高效液相色谱法;注射用硫酸长春新碱;含量

Content Determination of Vincristine Sulfate for Injection by HPLC

ZHU Rong(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of Vincristine sulfate for injection. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent HC-C₈ with mobile phase of 1.67% Diethylamine aqueous solution (adjusted to pH 7.5 with phosphoric acid)-methanol(38:62, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 297 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of vincristine sulfate was 0.032-3.2 mg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 99.3%-101.7% (RSD=0.6%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and sensitive, and can be used for the content determination of Vincristine sulfate for injection.

KEYWORDS HPLC; Vincristine sulfate for injection; Content

长春新碱(Vincristine, VCR)是1962年首次从长春花中提取的一种二聚吲哚类化合物,主要存在于长春花叶中。其可通过抑制微管蛋白的聚合而影响纺锤体微管的形成,从而发挥抗肿瘤作用,主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、何杰金氏淋巴瘤,也用于乳腺癌、支气管肺癌、软组织肉瘤及神经母细胞瘤等,临床应用较为广泛。长春新碱虽然抗肿瘤作用较好,但毒副作用大,主要表现为神经毒性,常见于大剂量或超剂量使用时,因此必须严格按照规定剂量使用^[1-3]。注射用硫酸长春新碱为长春新碱的静脉注射制剂,主要由硫酸长春新碱及冻干保护剂(一般为乳糖)制成。笔者参考相关文献^[4-9]并通过试验摸索确定了注射用硫酸长春新碱含量测定的高效液相色谱(HPLC)条件,同时将HPLC法测定结果与2010年版《中国药典》所用方法(紫外分光光度法)测定结果进行了比较,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括真空在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)和Chemstation化学工作站(美国Agilent公司);AB265-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

硫酸长春新碱对照品(北京盛世康普化工技术研究院,批号:140718,纯度:98.84%,105 ℃干燥2 h后使用);注射用硫酸长春新碱[深圳万乐药业有限公司,批号:1402V1(2批,来源地分别为深圳和新疆)、1309V2;广东岭南制药有限公司,批号:367008];硫酸长春新碱原料药(广州白云山汉方现代药业

有限公司,批号:B2140040);无水乳糖(DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG,批号:10655491);甲醇为色谱纯,二乙胺为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent HC-C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:35 ℃;流动相:1.67%二乙胺水溶液(用磷酸调pH至7.5)-甲醇(38:62, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:297 nm;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取硫酸长春新碱对照品25 mg,置于25 ml量瓶中,加入流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取样品内容物适量(相当于硫酸长春新碱25 mg),置于25 ml量瓶中,加入流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 模拟样品溶液的制备 精密称取硫酸长春新碱原料药和无水乳糖适量,按1:1比例混匀,精密称取混合粉末25 mg,加入流动相溶解并稀释至25 ml,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例和工艺制备缺硫酸长春新碱的阴性样品,精密称取25 mg,用流动相溶解并稀释至25 ml,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 专属性试验

精密吸取“2.2”项下制备的对照品溶液、供试品溶液、模拟样品溶液和阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,在硫酸长春新碱对照品色

*主管药师,硕士。研究方向:药品、化妆品检测及质量标准。电话:0771-5828448。E-mail:viviamsky@aliyun.com

谱峰相应的位置上,供试品色谱图中显示相同保留时间的色谱峰,而阴性对照在此位置无色谱峰出现,即阴性对照无干扰,表明该方法专属性良好。

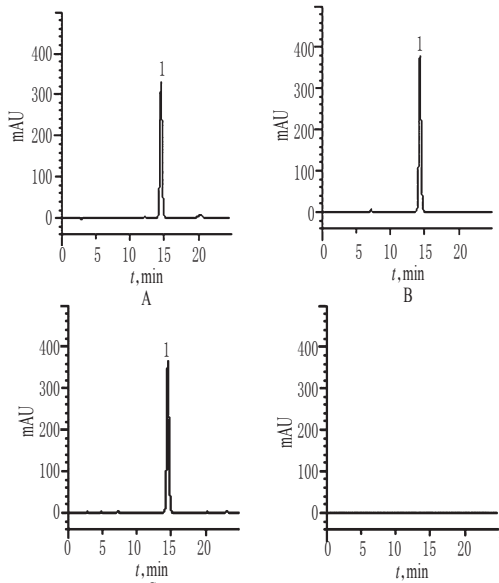


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.模拟样品;D.阴性对照;1.硫酸长春新碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.modeling sample; D.negative control; 1.vincristine sulfate

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液1、5、10、20、50 μl ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以硫酸长春新碱峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, mg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $y=768.54x+146801$ ($r=0.9999$)。结果表明,硫酸长春新碱检测质量浓度线性范围为3.2~0.032 mg/ml。

2.5 精密度试验

吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样5次,记录峰面积。结果,硫酸长春新碱峰面积的RSD=0.1% ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

吸取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1402V1,来源地深圳)适量,按“2.1”项下色谱条件分别于室温放置0、2、4、6、8、10、12 h时进样测定,记录峰面积。结果,硫酸长春新碱峰面积的RSD=0.1%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批样品(批号:1402V1,来源地深圳)适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液;另取模拟样品按“2.2.3”项下方法平行制备6份模拟样品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并分别计算标示百分含量。结果,硫酸长春新碱平均含量分别为102.7%、100.5%,RSD分别为0.4%、0.9% ($n=6$),表明本方法的重复性良好。

2.8 回收率试验

取“2.2.3”项下混合粉末适量,分别制成质量浓度为0.8、1.0、1.2 mg/ml的溶液各3份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表1。

2.9 样品含量测定

取4批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶

液,再将按“2.2.1”项下方法制备的对照品溶液和上述供试品溶液分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算硫酸长春新碱的标示百分含量,结果见表2。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=9$)

水平	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
80%	20.80	20.66	99.3	100.1	0.6
	20.38	20.35	99.8		
	20.31	20.02	99.8		
100%	24.72	24.30	99.3		
	25.45	25.88	101.7		
	27.22	27.25	100.1		
120%	30.98	31.19	100.7		
	30.50	30.52	100.1		
	32.12	32.74	100.1		

表2 样品含量测定结果($n=2$)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=2$)

批号	紫外分光光度法测得的平均含量,%	本法测得的平均含量,%
1402V1(深圳)	100.6	102.0
1402V1(新疆)	102.1	102.3
1309V2	103.2	102.1
367008	100.3	101.8

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用紫外分光光度法对硫酸长春新碱对照品溶液和阴性对照溶液在200~400 nm波长范围进行扫描。结果显示,硫酸长春新碱在297 nm波长处有最大吸收峰,而阴性对照在此波长处无吸收,故选择297 nm作为本试验的检测波长。

3.2 流动相的选择

参考《日本药局方》第16版(JP 16)和《美国药典》第35版(USP 35-NF 30)中硫酸长春新碱原料药的含量测定方法(HPLC法),以1.67%二乙胺水溶液(用磷酸调pH至7.5)-甲醇(38:62, V/V)为流动相。结果显示,在此条件下基线平稳、出峰时间适宜、峰形及分离度均良好,故选择其作为本研究的流动相。

3.3 对照品的选择

重复性试验中,直接取用未经干燥处理的对照品进行测定,用其标示的纯度计算供试品的标示百分含量,得平均含量为112.4%,所得结果不可信。后将对照品进行105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2 h的预处理后再对对照品溶液主峰进行峰面积归一化计算,用归一化计算所得百分含量计算供试品的标示百分含量,得平均含量为102.0%,结果在可接受范围内。由此可见,所购对照品标示的纯度不适用于HPLC法,建议选用在HPLC条件下主峰面积所占比例 $\leq 95\%$ 的对照品,且使用前必须经干燥处理。

综上所述,本方法准确、可靠、灵敏度高,可用于测定注射用硫酸长春新碱的含量。

参考文献

- [1] 习利平,宋新波,张丽娟.长春碱类抗肿瘤药的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(1):59.
- [2] 于兆海,陈刚.长春花生物碱的提取、分离、鉴定、制剂研究概述[J].中国药业,2009,18(14):85.
- [3] 刘贤明,胡歌,王华庆.长春新碱脂质体介导的肿瘤化疗研究现状[J].医学综述,2009,15(3):353.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年

柿叶总三萜的质量标准研究

乔金为^{1*}, 黄顺旺^{2,3}, 任燕茹¹, 汪海斌¹, 陈师农², 孙 备², 吴德玲^{1#}, 李玲芝³, 宋少江³ (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230022; 3. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0409-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.43

摘要 目的: 建立柿叶总三萜的质量标准。方法: 采用原位预处理-薄层色谱(TLC)法对样品中总三萜成分(齐墩果酸、熊果酸)进行定性鉴别。以熊果酸为对照品, 采用分光光度法测定总三萜的含量。采用高效液相色谱法测定齐墩果酸、熊果酸的含量; 色谱柱为 COSMOSIL5 C₁₈, 流动相为甲醇-0.2% 磷酸(82:18, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μl。结果: 齐墩果酸、熊果酸的 TLC 图斑点清晰, 分离度好。总三萜检测质量浓度线性范围为 7.52~45.12 μg/ml。齐墩果酸、熊果酸检测质量浓度线性范围分别为 18.4~184、18.8~188 μg/ml ($r=0.999\ 9$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2%; 加样回收率分别为 98.83%~102.11% (RSD=1.21%, $n=6$)、99.00%~103.80% (RSD=1.82%, $n=6$)。结论: 所建标准可用于柿叶总三萜的质量控制。

关键词 柿叶总三萜; 齐墩果酸; 熊果酸; 薄层色谱法; 分光光度法; 高效液相色谱法

Study on the Quality Standard of Total Triterpenoids in *Diospyros kaki* Leaves

QIAO Jinwei¹, HUANG Shunwang^{2,3}, REN Yanru¹, WANG Haibin¹, CHEN Shinong², SUN Bei², WU Deling¹, LI Lingzhi³, SONG Shaojiang³ (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Anhui Provincial Food and Drug Inspection Institute, Hefei 230022, China; 3. School of TCM, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of total triterpenoids in *Diospyros kaki* leaves. METHODS: In situ pretreatment-TLC was used for the qualitative identification of total triterpenoids (oleanolic acid and ursolic acid). With the reference of ursolic acid, spectrophotometry was used to determine the content of total triterpenoids. HPLC was used to determine the contents of oleanolic acid and ursolic acid; the column was COSMOSIL5 C₁₈ with mobile phase of methanol-0.2% phosphoric acid (82:18, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: TLC of oleanolic acid and ursolic acid showed clear spots and good separation. The linear range of total triterpenoids was 7.52-45.12 μg/ml. The linear range was 18.4-184 μg/ml for oleanolic acid ($r=0.999\ 9$) and 18.8-188 μg/ml for ursolic acid ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 98.83%-102.11% (RSD=1.21%, $n=6$) and 99.00%-103.80% (RSD=1.82%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of total triterpenoids in *D. kaki* leaves.

KEYWORDS Total triterpenoids in *Diospyros kaki* leaves; Oleanolic acid; Ursolic acid; TLC; Spectrophotometry; HPLC

柿叶为柿科柿属植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的新鲜或干燥叶, 收载于湖南、广东、广西省药材标准。临床常用于治疗冠心病、心绞痛、缺血性脑血管病、老年痴呆、糖尿病及胃溃疡出血、肺结核出血、功能性子宫出血等症^[1]。

陈光等^[2]报道, 从柿叶中分离得到的 α -香树脂醇、乌苏醇、

熊果酸、19 α -羟基乌苏酸、19 α -24-二羟基乌苏酸 5 种三萜类化合物具有抑制过氧化物产生和酪氨酸磷酸化的作用; 另外, 柿叶三萜粗提物对链脲佐菌素所致糖尿病模型小鼠有明显的降糖作用^[3]。目前, 国内外对柿叶有效部位总三萜的活性和含量研究报道较少。为此, 笔者对柿叶总三萜的质量控制进行了

版.北京:中国医药科技出版社,2010:964.

[5] The United States Pharmacopeial Convention. USP 35-NF 30[S].2012:5 025-5 027.

[6] 李华, 龙亚秋, 罗超华, 等. 高效液相色谱法测定硫酸长春新碱的有关物质[J]. 中国药业, 2012, 21(3): 24.

* 硕士研究生。研究方向: 天然药物。E-mail: 1186729971@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 天然药物。电话: 0551-65169045

[7] 罗婵, 母昭德. 肿瘤细胞内外长春新碱的高效液相色谱法测定[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(4): 452.

[8] 袁琦, 徐玫, 赵辉, 等. HPLC 法快速定量测定硫酸长春新碱[J]. 中成药, 2013, 36(6): 1 345.

[9] 齐鹏, 张永旺. HPLC 法测定组织中硫酸长春新碱的含量[J]. 河南大学学报: 医学版, 2014, 33(1): 30.

(收稿日期: 2015-01-06 修回日期: 2015-12-08)

(编辑: 周 箐)