

· 化学与分析 ·

两种方法测定复方苦参注射液中聚山梨酯 80 的含量

李建伟^{1*}, 周红军², 聂磊², 菅晓勇^{3*}

(1. 长治医学院, 山西 长治 046000; 2. 山西振东制药股份有限公司, 山西 长治 047100;
3. 北京康乐卫士生物技术股份有限公司, 北京 100176)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-ELSD 测定复方苦参注射液中聚山梨酯 80 含量的方法, 并与分光光度法测定结果进行比较。方法: 采用 TSKgel G2000SWXL 色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 5 μm)及保护柱, 流动相 20 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-乙腈(88:12), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C; ELSD 检测条件: 蒸发器温度 80 °C, 雾化器温度 60 °C, 氮气流速 2 L·min⁻¹, 进样体积 10 μL。结果: 聚山梨酯 80 在 13.11 ~ 52.42 μg 呈良好的线性关系($r=0.9992$), 平均回收率为 100.9%, RSD 2.2%; 与复方苦参注射液中聚山梨酯 80 理论投料量进行比较, UV 法测得结果偏高, HPLC-ELSD 法测定结果更接近理论值。结论: 该法操作简便, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于聚山梨酯 80 含量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 复方苦参注射液; 聚山梨酯 80; 紫外分光光度

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)15-0054-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1547.019.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:47

Two Methods for Determination of Polysorbate 80 in Fufang Kushen Injections

LI Jian-wei^{1*}, ZHOU Hong-jun², NIE Lei², JIAN Xiao-yong^{3*}

(1. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China;

2. Shanxi Zhendong Pharmaceutical Co. Ltd, Changzhi 047100, China;

3. Health Guard Biotechnology Co. Ltd, Beijing 100176, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method for polysorbate 80 in Fufang kushen injections by HPLC-ELSD, compare it with UV spectrophotometry. **Method:** HPLC-ELSD was adopted with a TSKgeL G2000SWXL (7.8 mm × 300 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of 0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate-acetonitrile (88:12) with the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30 °C. The temperature of drift tube was 80 °C. The flow rate of N₂ was 2 L·min⁻¹. **Result:** The linear range of polysorbate 80 was 13.11-52.42 μg ($r=0.9992$), and the average recovery was 100.9%, RSD 2.2%. Compared with the theoretical value of Polysorbate 80 in Fufang kushen injections, result of UV on the high side, results of HPLC-ELSD method was closer to the theoretical value. **Conclusion:** HPLC-ELSD is simple and accurate, and can be used in the determination of polysorbate 80.

[Key words] HPLC; Fufang kushen injections; polysorbate 80; UV

[收稿日期] 20140306(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09202-009)

[通讯作者] * 李建伟, 硕士, 讲师, 从事中药制剂质量控制研究, Tel:13935522309, E-mail:lyy7273@163.com

复方苦参注射液是以苦参和白土苓为原料经提取、精制而成的中药注射剂,具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛之功效,临床治疗癌肿疼痛、出血。现代研究表明其具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、提高机体免疫力等多种药理作用,临床上广泛用于非小细胞肺癌、原发性肝癌、消化道癌及恶性胸腔积水等重症疾病的辅助治疗。在抗癌、缓解癌肿疼痛、控制癌性出血、改善晚期癌症患者的一般状况、配合放疗增效减毒等方面效果显著^[1]。聚山梨酯80是一种非离子型表面活性剂,被用作增溶剂在中药注射剂中广泛使用。随着近年来研究的不断深入,中药注射剂中聚山梨酯80对药品安全性有重要的影响,按照国家关于中药注射剂安全性评价的要求,需要建立检测方法来对聚山梨酯80含量进行控制。聚山梨酯80的含量测定方法有多种,一般采用高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法^[2-5]和紫外-可见分光光度法^[6],笔者曾采用HPLC-UV法^[7]和GC法^[8]对复方苦参注射液中的聚山梨酯80进行含量测定。本试验分别采用HPLC-ELSD和紫外-可见分光光度法对复方苦参注射液中聚山梨酯80进行检测,并对测定结果与实际处方投料量进行了比较分析,采用HPLC-ELSD法测得结果更接近于理论含量。

1 材料

安捷伦1260系列高效液相色谱仪(385 ELSD型蒸发光检测器,Chemstation色谱工作站),TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计,VOTEX-2型涡旋振荡器,T-214型1/万电子天平(美国DENVER),TB-215 D型1/10万电子天平(美国DENVER)。

聚山梨酯80对照品(批号G01359,USP;批号130508,上海申宇;批号20131001,南京威尔化工),不同批号复方苦参注射液样品由山西振东制药股份有限公司提供。乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 含量测定

2.1 色谱条件 TSKgel G2000SWXL色谱柱(7.8 mm×300 mm,5 μm)及保护柱,流动相20 mmol·L⁻¹醋酸铵-乙腈(88:12),流速0.6 mL·min⁻¹,柱温30℃;ELSD检测条件:蒸发器温度80℃,雾化器温度60℃,氮气流速2 L·min⁻¹,进样体积10 μL。

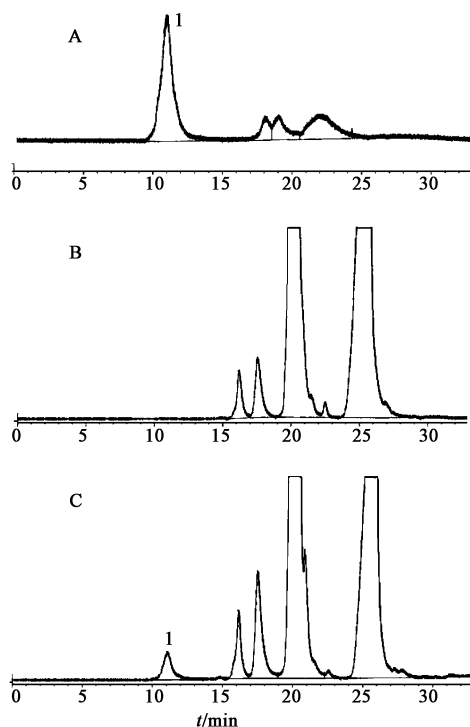
2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 取聚山梨酯80对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加水超声溶解,并稀释至刻度,制成每1 mL含2.621 0 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 取复方苦参注射液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取不含聚山梨酯80的复方苦参注射液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 专属性试验 精密吸取阴性样品溶液、对照品溶液及供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,见图1。结果表明,阴性样品中未见对照品峰,表明阴性无干扰,本方法专属性可行。



A. 对照品;B. 阴性样品;C. 供试品;1. 聚山梨酯80

图1 复方苦参注射液 HPLC

2.4 稳定性试验 取本品(批号20131106)按照供试品溶液制备方法制备,分别在0,2,4,8,12 h,精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,测定,聚山梨酯80在12 h峰面积积分值RSD 1.92%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液,连续进样6次,每次10 μL,测定峰面积,聚山梨酯80峰面积积分值RSD 1.84%,表明仪器精密度良好。

2.6 线性关系考察 精密吸取放至室温的聚山梨酯80对照品溶液(质量浓度2.621 g·L⁻¹)5,8,10,15,20 μL注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,以峰面积积分值对数为纵坐标,聚山梨酯80进样量的对数为横坐标绘制标准曲线,计算得回归方程为 $Y = 0.9026X + 2.7777$ ($r = 0.9992$),表明聚山梨酯80在13.11~52.42 μg,峰面积与进样量对数具有良好

线性关系。

2.7 重复性试验 取同一批号样品(20131106),按供试品溶液制备方法平行制备 6 份,测定峰面积,按外标两点法计算,结果显示供试品中聚山梨酯 80 的平均质量分数为 0.249%,RSD 1.75%,表明方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的同一批号样品(批号 20131106)9 份,每份 5 mL,至 10 mL 量瓶中,分别精密添加一定量的对照品并用水定容至刻度,进样 10 μL,结果见表 1。

表 1 苦参注射液 中聚山梨酯 80 加样回收率试验

No.	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	10.016	22.294	98.23		
2	10.016	22.509	100.39		
3	10.016	22.438	99.67		
4	12.462	25.403	103.90		
5	12.462	24.786	98.95	100.9	2.2
6	12.462	24.985	100.54		
7	14.985	27.389	99.66		
8	14.985	28.173	104.89		
9	14.985	27.691	101.67		

注:样品中量均为 12.45 μg。

结果表明,聚山梨酯 80 的平均回收率为 100.9%,RSD 2.2%,回收率良好,表明所建方法准确度较好,可以用于本品的含量测定。

3 紫外分光光度法

3.1 对照品溶液的制备 精密称定 0.5 g 聚山梨酯 80,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,配成 5 g·L⁻¹的对照品贮备液。

3.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.125, 0.15, 0.175, 0.200, 0.225, 0.250, 0.275, 0.300, 0.325, 0.350, 0.375 mL 置于 25 mL 比色管中,加水至 0.5 mL,加 8.0 mL 硫氰酸钴铵溶液(取硝酸钴 7.5 g,硫氰酸铵 50 g,加水使溶解并稀释至 250 mL)摇匀,精密加入二氯甲烷 5.0 mL,用涡旋振荡器振荡 3 min,后静置 15 min,去掉上层水溶液,移取下层二氯甲烷液,按照紫外-可见分光光度法(2010 年版《中国药典》二部附录 IV A),在 624 nm 处测定吸光度,即得。同法用二氯甲烷做空白实验。以聚山梨酯 80 的质量浓度为横坐标 X,吸光度 Y 为纵坐标绘制标准曲线方程,得回归方程为 $Y = 0.166 1X - 0.010 8$ ($r = 0.999 1$),表明聚山梨酯 80 在 1.25 ~ 3.75 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系。

3.3 供试品溶液的制备 取供试品适量 0.5 mL,

置具塞离心管中,自“加入硫氰酸钴铵溶液 8.0 mL 和二氯甲烷 5 mL”起,同标准曲线制备,即得。

3.4 阴性样品溶液的制备 取不含聚山梨酯 80 的复方苦参注射液,同供试品溶液的制备,即得。

3.5 准确度试验 精密量取 0.25 mL 供试品,精密加入定量的聚山梨酯 80 对照品溶液,置于 25 mL 比色管中,按照供试品项下测定方法,计算加样回收率(表 2),实验测得的回收率范围为 101.3% ~ 109.5%,平均回收率为 105.4%,RSD 为 2.6%。

表 2 苦参注射液中聚山梨酯 80 加样回收率

No.	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.375	1.098 0	106.8		
2	0.375	1.095 8	106.2		
3	0.375	1.085 3	103.4		
4	0.625	1.351 3	104.6		
5	0.625	1.346 9	103.9	105.4	2.6
6	0.625	1.358 8	105.8		
7	0.875	1.631 1	106.7		
8	0.875	1.655 6	109.5		
9	0.875	1.589 1	101.9		

注:样品中量均为 0.697 5 mg。

3.6 精密度试验 精密量取 0.5 mL 供试品(批量 20130134),按照供试品项下测定方法重复测定 9 次,实验结果显示,岩舒样品中聚山梨酯 80 的平均质量分数为 2.79%,RSD 为 1.40%。

3.7 重复性试验 精密量取 0.5 mL 供试样品(批量 20130134),平行 6 份,按照供试品项下测定方法重复测定,实验结果显示,岩舒样品中聚山梨酯 80 的平均质量分数为 0.273%,RSD 为 1.47%。

3.8 样品含量测定 取不同批次样品,分别采用以上两种方法测定聚山梨酯含量。结果见表 3,以水为空白溶液,UV 法测定的结果偏高,与 HPLC 法存在显著差异($P < 0.05$)以阴性样品做空白测得的结果与 HPLC 法测定结果进行配对 t 检验,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 讨论

采用紫外分光光度法测定聚山梨酯 80,考察了不同萃取方法对萃取的影响,结果发现采用文献^[6]的方法,使用摇床振荡,并补充二氯甲烷损失质量,操作繁琐,且耗时,通过改进混合方法,采用振荡 3 min,静置 15 min。而第二种方法相对而言,操作简单,节约时间。考察了不同溶剂二氯甲烷和三氯甲烷,三氯甲烷萃取效率高于二氯甲烷。

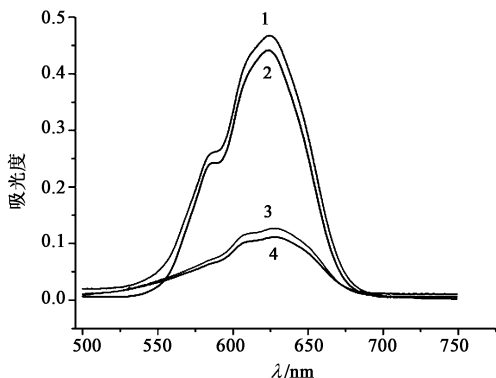
采用紫外分光光度法要经过显色反应和三氯甲

表 3 样品中聚山梨酯 80 的含量 %

批号	UV 法 (阴性空白)	HPLC 法	UV 法 (水为空白)
20120206	0.229	0.224	0.271
20121002	0.231	0.243	0.273
20121119	0.231	0.234	0.273
20121234	0.233	0.251	0.275
20130109	0.253	0.245	0.293
20130202	0.237	0.240	0.279
20130314	0.239	0.235	0.281
20130501	0.252	0.253	0.293
20130517	0.254	0.250	0.294
20121132	0.243	0.224	0.285
20130109	0.250	0.245	0.291
20130501	0.247	0.253	0.288
20130506	0.261	0.255	0.301

注:理论含量均为 0.25%。

烷萃取,受操作的影响较大,测定的结果精密度较低,同时显色剂的配置和放置时间等都会影响结果,需要严格控制操作的一致性,才能保证较好的精密度。通过对结果分析,以聚山梨酯 80 的水溶液绘制标准曲线测得的含量高于理论含量,通过对复方苦参注射液阴性样品的考察,证明阴性样品中含有可以和显色剂发生反应的物质,在 624 nm 波长处也可以产生紫外吸收(见图 2),因此,需要扣除阴性样品的本底吸收,采用阴性样品中添加不同浓度的聚山梨酯 80 绘制标准曲线,再对样品进行光度测定,带入标准曲线计算含量,可以消除复方苦参注射液本底产生的系统误差。但是在制订质量标准时,由于无法给检验单位提供阴性样品,因此,该方法不宜作为制订复方苦参注射液质量标准的法定方法。



1. 聚山梨酯 80 对照品溶液;2. 复方苦参注射液(批号 20121119);
3. 不含聚山梨酯 80 的样品溶液(批号 20121119);
4. 不含聚山梨酯 80 的样品溶液(批号 20131128)

图 2 聚山梨酯 80 及复方苦参注射液显色后紫外吸收光谱

由于市售的药用聚山梨酯 80 是混合物,不同厂家、不同批次的聚山梨酯 80 的成分组成不同,在实际测定中我们发现,同样浓度、来源不同、批次不同的聚山梨酯 80 与显色剂显色后,吸光度存在差异。采用 HPLC-ELSD 测定不同厂家、不同批次的聚山梨酯 80,单位浓度的响应峰面积也不同(结果见表 4)。不同国家药典对聚山梨酯 80 的控制项目不同,而《中国药典》没有对药用聚山梨酯 80 纯度进行控制,在制剂生产中添加的聚山梨酯 80 存在一定的差异,因此会导致添加量和测得量存在一定的差异,在制订质量标准时应考虑不同来源、不同批次以及对对照品纯度对测定结果的影响。

表 4 不同厂家聚山梨酯 80 比较

厂家	批号	质量浓度 /g·L ⁻¹	峰面积 /mV·S	平均 峰面积 /mV·S	单位浓度 响应值
USP	G01359	2.621 0	10 331.1	10 052.75	3 835.46
			9 774.4		
上海申宇	130508	2.528 5	10 725.4	10 673.30	4 221.20
			10 621.2		
南京威尔	20131001	2.477 7	6 373.8	6 661.55	2 688.60
			6 949.3		

[参考文献]

[1] 马悦,张启伟,王智民,等. 复方苦参注射液研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):342.
 [2] 吴毅,梁成罡,金少鸿,等. SEC-ELSD 法测定中药注射液中聚山梨酯 80 的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(1):12.
 [3] 董媛,张繁华,刘莹莹. 中药注射剂中添加聚山梨酯 80 的快速检测[J]. 西北药学杂志,2010,25(4):248.
 [4] 李樱红,黄琴伟,祝明,等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定冠心宁注射液中聚山梨酯 80 的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(5):826.
 [5] 刘燕梅,蒲旭峰,张良,等. 比色法测定鱼腥草注射液中聚山梨酯 80 的含量[J]. 中国药品标准,2008,9(6):434.
 [6] 曹静,于健东,郑笑为,等. 生脉注射液中聚山梨酯 80 含量测定[J]. 中国药师,2013,16(9):1377.
 [7] 李建伟,聂磊,柴青叶. HPLC 法测定复方苦参注射液中聚山梨酯 80 的含量[J]. 中国药师,2013,16(2):244.
 [8] 李建伟,赵莹,聂磊. GC 法测定复方苦参注射液中聚山梨酯 80 的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(10):1993.

[责任编辑 顾雪竹]