



垂体后叶注射液含量 HPLC 法和生物效价测定法等效性研究^{*}

张 莹^{1,2}, 杜 益^{2,3}, 潘余睿智¹, 汪玉馨², 陆益红^{2**}, 刘建平^{1**}

(1. 中国药科大学, 南京 210009; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008;

3. 徐州医科大学药物分析教研室, 徐州 221004)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定垂体后叶注射液中赖氨酸加压素及缩宫素的含量, 并研究《中华人民共和国药典》2015 年版生物效价测定法与本文的 HPLC 测定法的相关性与等效性。方法: 采用 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 为流动相 A, 水-乙腈 (1:1) 为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 40 ℃。结果: 在上述色谱条件下, 赖氨酸加压素峰与缩宫素峰以及相邻杂质峰之间分离度符合要求; 赖氨酸加压素与缩宫素浓度分别在 0.42~13.33 IU·mL⁻¹ 和 0.33~21.00 IU·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, $r=0.999\ 9$; 平均回收率 ($n=9$) 分别为 100.5% 和 99.7%。6 批样品中上述 2 个成分含量范围分别为 6.10~6.40 IU·mL⁻¹ 和 5.63~5.93 IU·mL⁻¹。用 SPSS 软件进行相关性分析, 结果表明, 生物效价法与 HPLC 法含量测定呈正相关, Pearson 系数分别为 0.897 和 0.947。SAS 软件等效性分析表明: 加压素生物效价法与 HPLC 法的测定结果具有等效性, 而缩宫素的两法测定结果不具有等效性。结论: 本法专属性良好, 准确度高, 重复性好, 与生物效价测定法相关性较好, 可用于垂体后叶注射液中赖氨酸加压素含量测定。

关键词: 垂体后叶注射液; 赖氨酸加压素; 缩宫素; 含量测定; 等效性分析; 高效液相色谱法; 生物效价测定法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 10-1830-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.10.25

HPLC determination of posterior pituitary injection and comparison with biological titer measurement^{*}

ZHANG Ying^{1,2}, DU Yi^{2,3}, PANYU Rui-zhi¹, WANG Yu-xin²,
LU Yi-hong^{2**}, LIU Jian-ping^{1**}

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China;

3. Department of Pharmaceutical Analysis, Xuzhou Medicine University, Xuzhou 221004, China)

Abstract Objective: To establish an analysis method of HPLC for simultaneous determination of lysine vasopressin and oxytocin in the posterior pituitary injection, and to study the correlation and equivalence between

^{*} 国家科技重大专项 (2015ZX09303001)

^{**} 通信作者 陆益红 Tel: (025) 86251220; E-mail: yihonglu@163.com

刘建平 Tel: (025) 83271293; E-mail: liujianping@hotmail.com

第一作者 张 莹 Tel: 18251812609; E-mail: lz18251812609@163.com

杜 益 Tel: 15950533855; E-mail: a838412310@163.com

the biological assay and HPLC method. **Methods:** A C_{18} column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m) was adopted. Phosphate buffer solution (pH 6.0) was used as mobile phase A and the water-acetonitrile (1 : 1) was used as mobile phase B with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$. The detection wavelength was 220 nm and the column temperature was set at 40 $^{\circ}$ C. **Results:** Under the chromatographic condition, resolution between the peaks of lysine vasopressin, oxytocin and other related substances met the requirements. This method showed good linearity between peak area and concentration of lysine vasopressin and oxytocin over the range of 0.42–13.33 IU $\cdot$ mL $^{-1}$ and 0.33–21.00 IU $\cdot$ mL $^{-1}$, respectively with $r^2=0.999\ 9$. The average recoveries ($n=9$) of lysine vasopressin and oxytocin were 100.5% and 99.7%, respectively. The contents of lysine vasopressin and oxytocin in the 6 batches of samples were 6.10–6.40 IU $\cdot$ mL $^{-1}$ and 5.63–5.93 IU $\cdot$ mL $^{-1}$. The biological titer measurement method was positively correlated with the HPLC method, which Pearson coefficients were 0.897 and 0.947, respectively. SAS software equivalent analysis showed that biological titer measurement and HPLC method were equivalent for lysine vasopressin, but for oxytocin, the two methods were not equivalent. **Conclusion:** The method has excellent specificity, high accuracy and good reproducibility. It has a good correlation with biological assay, which can be used for the determination of lysine vasopressin in posterior pituitary injection.

Keywords: posterior pituitary injection; lysine vasopressin; oxytocin; content determination; equivalent analysis; HPLC; biological titer measurement

垂体后叶注射液是国家基本药物,其主要成分为加压素和缩宫素,是猪(羊或牛)脑垂体后叶经脱水、干燥、研细制成的垂体后叶粉再经稀醋酸提取、滤过制得的无菌溶液,为激素类药物。加压素和缩宫素均为九肽化合物,具有升压和缩宫作用,猪源加压素为 8-位赖氨酸,有别于其他哺乳动物来源(如人、

牛等)的加压素,后者为 8-位精氨酸;不同来源的缩宫素结构均相同^[1-2],两化合物的分子式和结构式见图 1。垂体后叶临床主要用于肺、支气管出血(如咯血)消化道出血(呕血、便血)^[3],并适用于产科催产及产后收缩子宫、止血、腹腔手术后肠道麻痹、尿崩症等^[4]。

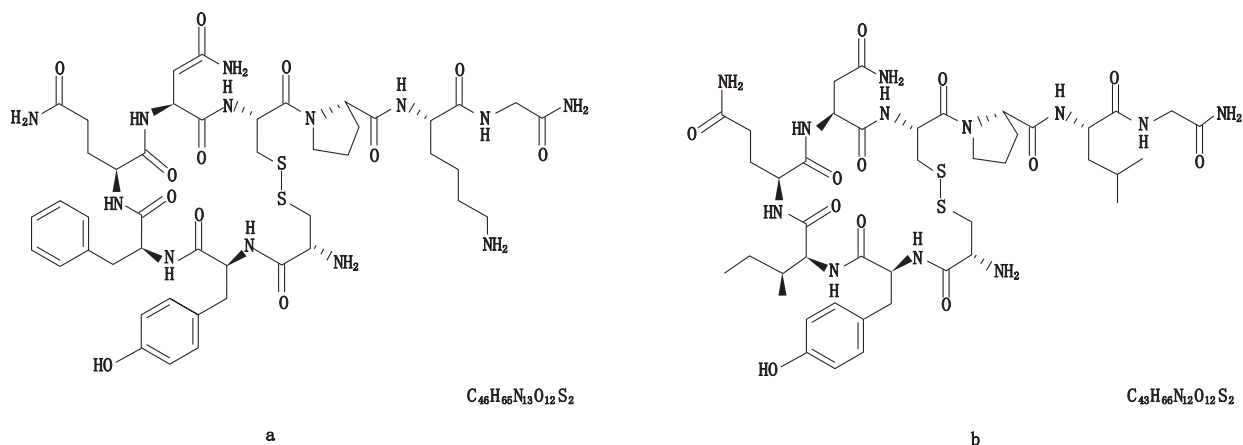


图 1 赖氨酸加压素 (a) 和缩宫素 (b) 结构式和分子式

Fig. 1 The chemical structures and molecular formula of lysine vasopressin (a) and oxytocin (b)

垂体后叶及其注射液质量标准仅收载于《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2015 版二部^[5],其主成分加压素及缩宫素的含量均采用生物效价测

定法测定^[6]。由于生物效价测定法存在检验周期长,操作复杂费力,测定误差较大,重复性欠佳等问题,特别是对于限度边缘产品结果的判定,检验人

员需要有足够的经验和能力,不利于药品质量的控制^[7-8]。因此,参考相关文献^[9-12],本文建立了同时测定垂体后叶注射液中赖氨酸加压素与缩宫素含量的高效液相色谱法(HPLC法),并进行方法学验证;将HPLC法与生物效价测定法测定结果进行比较,考察2种方法的相关性和等效性,为HPLC法替代生物效价测定法提供依据。

1 仪器与试剂

岛津LC20高效液相色谱仪(PDA检测器); Waters Xbridge C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Milli-Q Gradient 超纯水系统; 奥尔科特离体器官测定系统; 生物统计软件 BS 2000 (中国食品药品检定研究院); SPSS 17.0 统计软件 (IBM 公司); SAS 9.2 统计软件 (SAS 软件研究所)。

缩宫素国家标准品 (中国食品药品检定研究院, 21 IU · 支⁻¹, 批号 150529-200902); 赖氨酸加压素国家标准品 (中国食品药品检定研究院, 4 IU · 支⁻¹, 批号 101525-201301); 缩宫素欧洲药典标准品 (0.96 mg · 瓶⁻¹, 600 IU · mg⁻¹, 批号 4.0); 垂体后叶注射液 (A 厂家, 规格为 1 mL : 6 IU, 批号 160501、160502、160503、160504、160505、160506); 缩宫素高纯度合成原料 (B 厂家, 批号 160507、1609001、609002、1610003、1610004); 乙腈为色谱纯, 三氯叔丁醇为化学纯, 其余试剂均为分析纯。

2 试验方法

2.1 HPLC 法 采用 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以磷酸盐缓冲液 (22.56 g 磷酸二氢钠与 0.85 g 磷酸氢二钠溶于 1 000 mL 水中, 用氢氧化钠调节 pH 至 6.0) 为流动相 A, 以水-乙腈 (1 : 1) 为流动相 B, 进行线性梯度洗脱 [流动相 A-流动相 B 比例: 0 min (75 : 25) → 20 min (75 : 25) → 50 min (40 : 60) → 50.1 min (75 : 25) → 60 min (75 : 25)], 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 40 °C。取赖氨酸加压素标准品、缩宫素标准品各适量, 加 0.25% 醋酸溶液制成 1 mL 中含赖氨酸加压素和缩宫素均为 6 IU 的混合标准品溶液, 作为系统适用性试验溶液。赖氨酸加压素峰与缩宫素峰的分度应大于 5.0。

取垂体后叶注射液作为供试品溶液; 另取赖氨酸加压素标准品和缩宫素标准品适量, 用 0.25% 醋酸溶液溶解并稀释至浓度均为 6 IU · mL⁻¹ 的混合溶液, 作为标准品溶液; 分别精密量取供试品溶液和标准品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

按外标法以峰面积分别计算样品中赖氨酸加压素和缩宫素的含量。

精密称取高纯度合成缩宫素原料适量, 用 0.25% 醋酸溶液溶解并稀释至浓度均为 5 IU · mL⁻¹ 的溶液, 另取缩宫素欧洲药典标准品适量, 用 0.25% 醋酸溶液溶解并稀释至浓度均为 5 IU · mL⁻¹ 的溶液, 作为标准品溶液; 分别精密量取供试品溶液和标准品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算样品中缩宫素的含量。

2.2 生物效价测定法 照《中国药典》2015 年版四部加压素生物测定法 (通则 1205) 和缩宫素生物测定法 (通则 1210) 测定效价^[6]。测定结果照《中国药典》2015 年版四部生物检定统计法中量反应平行线测定法 (通则 1431) 做实验可靠性测验, 试验结果可靠者计算效价, 统计计算采用生物统计程序软件 BS 2000。

3 方法学考察

3.1 专属性试验 由于缺乏赖氨酸加压素和缩宫素 2 种物质的杂质对照品, 通过使用多种破坏性实验而产生特异性杂质进行专属性试验。酸破坏: 取垂体后叶注射液 1 mL, 加强酸 (0.5 mol · L⁻¹ 盐酸) 1 mL, 30 min 后加 0.5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和, 精密量取 20 μL, 按“2.1”项条件进行分析。碱破坏: 取垂体后叶注射液 1 mL, 加氢氧化钠 (0.5 mol · L⁻¹) 1 mL, 30 min 后加 0.5 mol · L⁻¹ 盐酸 1 mL 中和, 精密量取 20 μL, 按“2.1”项条件进行分析。高温破坏: 取垂体后叶注射液 1 mL, 高温 (沸水浴, 2 h) 破坏后, 精密量取 20 μL, 按“2.1”项条件进行分析。

结果表明: 经破坏试验后产生各个降解产物均与主成分有较好的分离度 (图 2), 不干扰主成分的测定, 该方法专属性良好。

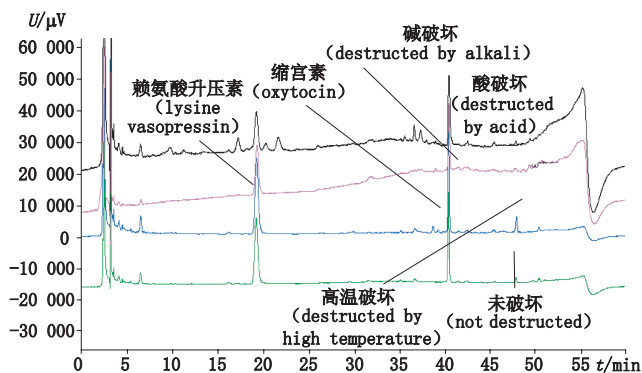


图 2 方法专属性考察图谱

Fig. 2 Chromatograms for specificity test

3.2 线性关系考察 取赖氨酸加压素与缩宫素的标准品适量,用 0.25% 醋酸溶液溶解并稀释制成每 1 mL 含赖氨酸加压素为 13.33、6.67、3.33、1.67、0.833、0.42、0.21 IU 和含缩宫素 21.00、10.50、5.25、2.625、1.31、0.66、0.33 IU 的系列混合标准品溶液,分别精密量取 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积 (Y) 对浓度 (X) 进行线性回归,赖氨酸加压素及缩宫素回归方程分别为:

$$Y=48\ 365X-1\ 603.8 \quad r=0.999\ 9$$

$$Y=27\ 301X+257.83 \quad r=0.999\ 9$$

结果表明:赖氨酸加压素浓度在 0.42~13.33 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,缩宫素浓度在 0.33~21.00 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,与色谱峰面积呈良好线性关系。

3.3 检测下限、定量下限测定 取“3.2”项下每 1 mL 含赖氨酸加压素 0.42 IU 和缩宫素 0.66 IU 的混合标准品溶液适量,用 0.25% 醋酸溶液稀释,按“2.1”项条件进行分析。结果赖氨酸加压素定量下限 ($S/N=10$) 为 0.378 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测下限 ($S/N=3$) 为 0.09 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$;缩宫素定量下限 ($S/N=10$) 为 0.144 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测下限 ($S/N=3$) 为 0.04 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 重复性试验 取垂体后叶注射液同批样品(批号 150503)6 份,分别精密量取 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,分别计算 6 次赖氨酸加压素和缩宫素峰面积测定结果的 RSD 分别为 0.18% 和 0.35%,表明重复性较好。

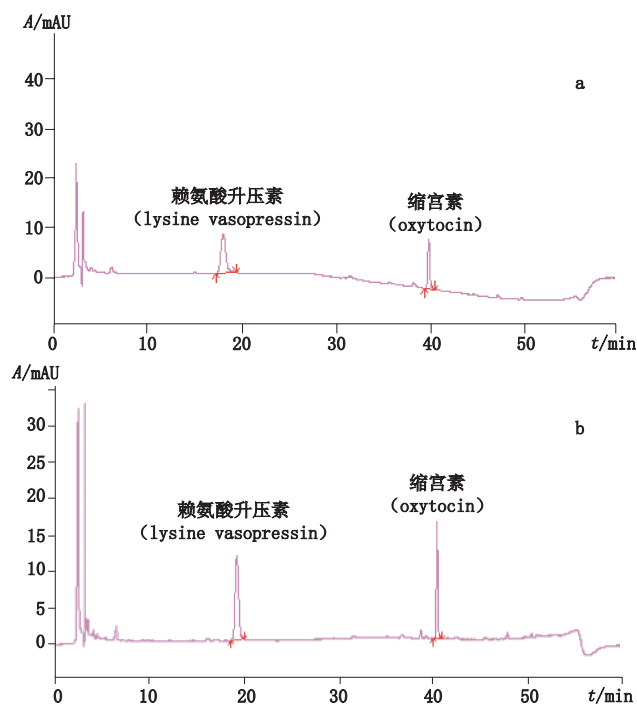
3.5 稳定性试验 取垂体后叶注射液同批样品(批号 150503),置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 进样盘中,于 0、1、3、5、26、30 h 分别进样,以峰面积考察溶液稳定性。结果表明:2 种主成分峰面积均无显著下降,溶液在 30 h 内稳定。

3.6 回收率试验 取已知含量的垂体后叶注射液样品(批号 150503)1 mL,共 9 份,分别精密加入赖氨酸加压素和缩宫素的标准品适量,制成每 1 mL 含有赖氨酸加压素和缩宫素均为 7.2、6.0、4.8 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的高、中、低 3 个浓度的供试溶液各 3 份,进样测定,结果赖氨酸加压素高、中、低 3 个浓度水平的回收率 ($n=3$) 分别为 101.4% ($\text{RSD}=0.29\%$)、100.8% ($\text{RSD}=0.52\%$)、99.4% ($\text{RSD}=0.31\%$),平均回收率 ($n=9$) 为 100.5%;缩宫素高、中、低 3 个浓度水平的回收率 ($n=3$) 分别为 98.6% ($\text{RSD}=0.75\%$)、98.9% ($\text{RSD}=0.61\%$)、98.7% ($\text{RSD}=1.1\%$),平均回收率 ($n=9$) 为 98.7%。

4 结果

4.1 HPLC 法系统适用性试验及样品测定 在上述

色谱条件下,垂体后叶中赖氨酸加压素和缩宫素 2 个主成分峰分离度不小于 5.0,可用于它们的测定,见图 3。



a. 混合标准品 (mixed standard substances) b. 垂体后叶注射液样品 (sample of posterior pituitary injection)

图 3 垂体后叶注射液含量测定典型色谱图

Fig. 3 Typical chromatograms for the posterior pituitary injection

按“2.1”项下方法,测定 6 批垂体后叶注射剂样品含量(每个批号取 2 份样品,每份样品进样 2 次),结果见表 1,表明 6 批垂体后叶注射液中赖氨酸加压素含量范围为 6.10~6.40 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,缩宫素含量范围为 5.63~5.93 $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 HPLC 法垂体后叶注射液含量测定结果 ($n=4$)

Tab. 1 The results of lysine vasopressin and oxytocin determination of posterior pituitary injection

批号 (lot No.)	赖氨酸加压素 (lysine vasopressin)		缩宫素 (oxytocin)	
	均值 (average) / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	均值 (average) / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%
160501	6.39	0.81	5.95	1.0
160502	6.34	0.48	5.86	1.3
160503	6.40	0.27	5.86	0.74
160504	6.13	0.47	5.64	0.66
160505	6.17	1.7	5.68	1.3
160506	6.10	0.45	5.65	0.51



4.2 HPLC 法与生物效价测定法比对及相关性和等效性考察 分别按照“2.1”、“2.2”项下方法,对 6 批 垂体后叶注射液分别采用 HPLC 法与生物效价测定法测定含量或效价,见表 2。

表 2 HPLC 法与生物测定法结果汇总

Tab. 2 The results of HPLC and biological titer measurement of posterior pituitary injection

批号 (lot No.)	赖氨酸加压素 (lysine vasopressin)			缩宫素 (oxytocin)		
	HPLC 含量 (HPLC content)/ (IU · mL ⁻¹)	生物效价 (biological potency)/ (IU · mL ⁻¹)	相对偏差 (relative deviation)/%	HPLC 含量 (HPLC content)/ (IU · mL ⁻¹)	生物效价 (biological potency)/ (IU · mL ⁻¹)	相对偏差 (relative deviation)/%
160501	6.39	6.20	3.2	5.95	7.08	16.4
160502	6.34	6.10	4.0	5.86	7.07	17.5
160503	6.40	6.10	5.0	5.86	7.06	17.4
160504	6.13	5.84	4.8	5.64	6.84	17.4
160505	6.17	5.89	4.7	5.68	6.66	14.2
160506	6.10	5.90	3.3	5.65	6.72	15.5

以生物效价测定法结果为因变量(X), HPLC 法测定结果为自变量(Y),采用 SPSS 17.0 统计软件分析相关性,结果显示其 2 种测定法下主要成分均具有相关性,赖氨酸加压素和缩宫素 Pearson 系数分别为 0.897 和 0.947,见表 3。

表 3 HPLC 法和生物检定法测定样品含量结果的相关性考察

Tab. 3 Correlation study of posterior pituitary injection content measured by HPLC and biological titer measurement

成分 (component)	方法 (method)	相关性 (correlation)	HPLC 测定 (HPLC determination)	生物测定 (bioassay)
赖氨酸加压素 (lysine vasopressin)	HPLC 测定 (HPLC determination)	Pearson 相关性 (Pearson correlation)	1	0.897
		显著性 (双侧) Sig. (2-tailed)		0.015
		样本量 (number of samples) N	6	6
	生物测定 (bioassay)	Pearson 相关性 (Pearson correlation)	0.897	1
		显著性 (双侧) Sig. (2-tailed)		0.015
		样本量 (number of samples) N	6	6
缩宫素 (oxytocin)	HPLC 测定 (HPLC determination)	Pearson 相关性 (Pearson correlation)	1	0.947
		显著性 (双侧) Sig. (2-tailed)		0.004
		样本量 (number of samples) N	6	6
	生物测定 (bioassay)	Pearson 相关性 (Pearson correlation)	0.947	1
		显著性 (双侧) Sig. (2-tailed)		0.004
		样本量 (number of samples) N	6	6

以生物效价测定法测定结果为参比组,分别以赖氨酸加压素和缩宫素参比组均数可信限率 20% 和 10% 为等效界值,采用 SAS 9.2 统计软件分析等效性,结果显示赖氨酸加压素 2 种测定法的结果具有等效性,缩宫素 2 种测定法结果不具有等效性,结果见图 4、5。

TOST Level 0.05 Equivalence Analysis

c	Method	Mean	Lower Bound	90% CL Mean	Upper Bound	Assessment
Diff (1-2)	Pooled	0.266 7	-1.201 <	0.130 1 0.403 2 <	1.201	Equivalent
Diff (1-2)	Satterthwaite	0.266 7	-1.201 <	0.130 0 0.403 3 <	1.201	Equivalent

图 4 赖氨酸加压素 SAS 9.2 等效性分析

Fig. 4 SAS 9.2 equivalency analysis of lysine vasopressin

TOST Level 0.05 Equivalence Analysis

c	Method	Mean	Lower Bound	90% CL Mean	Upper Bound	Assessment
Diff (1-2)	Pooled	-1.131 7	-0.691 >	-1.303 1 -0.960 3 <	0.690 5	Not equivalent
Diff (1-2)	Satterthwaite	-1.131 7	-0.691 >	-1.305 2 -0.958 2 <	0.690 5	Not equivalent

图 5 缩宫素 SAS 9.2 等效性分析

Fig. 5 SAS 9.2 equivalency analysis of oxytocin

4.3 缩宫素效价验证 为分析造成垂体后叶注射液中缩宫素 2 种测定方法不等效的原因,按“2.1”项下 HPLC 法,用欧洲药典缩宫素标准品标定中国食品药品检定研究院合成缩宫素国家标准品,测定结果为标示量的 98.6%,2 种标准品的效价基本一致;采用“2.1”项下 HPLC 法和“2.2”项下生物效价测定法,以欧洲药典标准品对高纯度合成缩宫素原料进行 HPLC 法与生物效价测定法含量或效价测定,结果见表 4,以生物测定法测定结果为参比组,以缩宫素参比组均数可信限率 10% 为等效界值,采用 SAS 9.2 统计软件进行等效性分析,结果显示缩宫素 2 种测定法的测定结果具有等效性,因此,对于高纯度缩宫素,生物效价测定法和 HPLC 法可以相互替代。结果如图 6。

表 4 缩宫素原料药 HPLC 法和生物效价测定法测定结果

Tab. 4 HPLC and biological titer measurement results of oxytocin API

批号 (lot No.)	生物效价 (biological potency) / (IU · mL ⁻¹)	HPLC 含量 (HPLC content) / (IU · mL ⁻¹)	相对偏差 (relative deviation) /%
160507	545	542	0.6
1609001	527	536	1.7
1609002	528	530	0.4
1610003	552	552	0.0
1610004	527	524	0.6

TOST Level 0.05 Equivalence Analysis

c	Method	Mean	Lower Bound	90% CL Mean	Upper Bound	Assessment
Diff (1-2)	Pooled	-1.000 0	-53.58 <	-14.355 1 12.355 1 <	53.58	Equivalent
Diff (1-2)	Satterthwaite	-1.000 0	-53.58 <	-14.369 5 12.369 5 <	53.58	Equivalent

图 6 缩宫素原料药 SAS 9.2 等效性分析

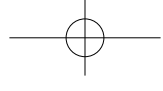
Fig. 6 SAS 9.2 equivalency analysis of oxytocin API

5 讨论

针对现行质量标准《中国药典》2015 年版中采用生物效价测定法测定垂体后叶注射液中赖氨酸加压素和缩宫素两主成分的效价,本文参照国外药典及文献中单组分的测定方法,建立了灵敏度高,专属性强,同时测定赖氨酸加压素和缩宫素含量的 HPLC 法,并进行方法学验证。曾采用 USP 35-NF 30^[13] 收录的(精氨酸)加压素含量测定项下的色谱条件以及 EP 8.0^[14] 收录的赖氨酸加压素含量测定项下的色

谱条件,主峰均在 10 min 内出峰,与杂质无法基线分离,专属性差,基线噪音较大,这可能是因为 USP 35-NF 30^[13]、EP 8.0^[14] 只测定加压素 1 种成分,且纯度较高。新建的 HPLC 法优化了色谱条件,调节流动相的缓冲盐种类,将 pH 调至 6.0 并且流动相采用洗脱梯度,降低基线噪音,使主成分与各个杂质有较好的分离度,增强方法的专属性和准确度,从而达到可同时测定垂体后叶注射液中赖氨酸加压素和缩宫素的含量。

以新建的 HPLC 法测得垂体后叶注射液中赖氨



酸升压素含量与生物效价测定法所得结果基本一致,经 SPSS 软件分析具有良好的相关性,经 SAS 软件分析,两法测定结果具有等效性。HPLC 法可以替代生物效价测定法用于垂体后叶注射液中赖氨酸升压素的含量测定。

以新建的 HPLC 法测得垂体后叶注射液中缩宫素含量与生物效价测定法所得结果,经 SPSS 软件分析具有良好的相关性,但经 SAS 软件分析,两法测定结果不具有等效性。为进一步分析两法测定垂体后叶注射液中缩宫素含量不等效的原因,又以新建 HPLC 法对高纯度合成缩宫素原料进行测定,结果表明两法测定结果基本一致,经 SAS 软件分析,两法测定结果具有等效性。因此,当测定样品中组分纯度较高时, HPLC 法与生物效价测定法结果更为一致, HPLC 法可以替代生物效价测定法。垂体后叶注射液中缩宫素结果不等效的原因可能是垂体后叶为生物提取得到,成分复杂,注射液中可能存在除缩宫素以外的 1 种或几种具有引起子宫收缩活性的杂蛋白^[2];也可能在制剂生产和贮存中因主成分水解、氧化、外消旋化、二硫键的断裂及重排、 β 消除、凝聚、沉淀和吸附等产生有关物质^[15],由于生物效价测定法专属性差,无法控制有机杂质及活性组分, HPLC 法专属性强,可以对活性成分和杂质实现有效分离,故而生物效价测定法结果高于 HPLC 法。后期本课题组将对垂体后叶及注射液的杂质谱进行研究,确证活性成分和毒性杂质的种类,分析产生杂质的原因,为企业进一步提高产品质量提供依据。

综上所述,新建 HPLC 法专属性强,灵敏度高,重复性好,能同时测定垂体后叶注射液中赖氨酸升压素和缩宫素 2 种主成分的含量,与生物效价测定法相关性较好,经 SAS 软件进行统计分析,新建 HPLC 法在赖氨酸升压素含量测定时可以替代生物效价测定法,而缩宫素的含量测定目前尚不能替代,仍采用生物效价测定法。

参考文献

- [1] 陈宇星,冯淑玲,孙红. 垂体后叶素的不良反应与安全应用[J]. 福建医药杂志, 2008, 30(2): 121
CHEN YX, FENG SL, SUN H. Adverse drug reaction and safety application of posterior pituitary[J]. Fujian Med J, 2008, 30(2): 121
- [2] 汪泓,郑璐侠,史芳亮,等. 垂体后叶注射液中主成分和杂蛋白谱的生物质谱研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 505
WANG H, ZHENG LX, SHI FL, et al. Profiling of key components and impurity proteins of posterior pituitary injection by mass spectrometry[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(3): 505
- [3] 翟洁卿,殷思纯,何松美. 垂体后叶素治疗肺结核咯血 105 例临床观察[J]. 当代医学, 2012, 18(17): 280
ZHAI JQ, YIN SC, HE SM. Clinical observation of pituitrin in the treatment of 105 cases of hemoptysis due to pulmonary tuberculosis[J]. Contemp Med, 2012, 18(17): 280
- [4] 张爱倩,薛敏,徐大宝. 垂体后叶素及血管加压素在妇科手术中的应用[J]. 实用妇产杂志, 2014, 30(2): 97
ZHANG AQ, XUE M, XU DB. The use of pituitrin and vasopressin in gynecologic surgery[J]. Pract Obstet Gynecol, 2014, 30(2): 97
- [5] 中华人民共和国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 657
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 657
- [6] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 157, 168
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 157, 168
- [7] 李海芳,钱德明. 缩宫素生物效价测定实验的几点体会[J]. 中国药品标准, 2008, 19(4): 247
LI HF, QIAN DM. Some experiences on biological value test of oxytocin[J]. Drug Stand China, 2008, 19(4): 247
- [8] 许雷鸣,顾倩,堵伟锋,等. 大鼠离体子宫法与高效液相色谱法测定缩宫素效价的相关性分析[J]. 安徽医药, 2014, 18(1): 37
XU LM, GU Q, DU WF, et al. Correlation between isolated rats uterus method and HPLC method for oxytocin assay[J]. Anhui Med Pharm J, 2014, 18(1): 37
- [9] 窦晓睿,艾小霞,高炎,等. 多肽类药物含量(效价)测定方法及其应用[J]. 药学进展, 2011, 35(12): 536
DOU XR, AI XX, GAO Y, et al. The determination method of content/potency for polypeptide drugs and their application[J]. Prog Pharm Sci, 2011, 35(12): 536
- [10] 陈建国,陆益红,史清水,等. 缩宫素的制备及其质量分析研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 698
CHEN JG, LU YH, SHI QS, et al. Research advances in the preparation and quality control of oxytocin[J]. Chin J Biochem Pharm, 2012, 33(5): 698
- [11] 黄青,陆益红,史清水,等. 高效液相色谱法测定缩宫素注射液含量及其与生物效价测定方法比较和应用[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1115
HUANG Q, LU YH, SHI QS, et al. HPLC determination of oxytocin injection and comparison with biological titer measurement and its applications[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(6): 1115
- [12] CHAIBVA FA, WALKER RB. Development and validation of a stability indicating analytical method for the quantitation of oxytocin in pharmaceutical dosage forms[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1): 179
- [13] USP 35-NF 30. Vol III [S]. 2012: 5006
- [14] EP 8.0. Vol I [S]. 2013: 2948
- [15] 白海娇,王亚敏,丁一. 多肽类药物有关物质研究的探讨[J]. 天津药学, 2013, 25(1): 9
BAI HJ, WANG YM, DING Y. Research on the related substances of polypeptide drugs[J]. Tanjing Pharm, 2013, 25(1): 9

(本文于 2017 年 9 月 25 日收到)