

5 讨论

芫花粗提物中的主要成分芹菜素、3'-羟基芫花素和芫花素与血浆蛋白具有一定的结合力,在生物样品处理时会造成样品提取回收率低和重现性差的情况。采用液-液萃取的方法处理样品,样品测定时专属性好,重复性高。该方法的建立有助于芫花药材在新药开发方面的研究,以及为芫花药物的临床应用提供有效的监测手段。

REFERENCES

- [1] CHEN Y Y, DUAN J A, TANG Y P, et al. Chemical constituents from flower buds of *Daphne genkwa* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(4): 397-402.
- [2] WU H T, JIANG C P, SONG H P, et al. Variation of four flavonoids in *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. processed by different methods [J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医学报), 2012, 40(3): 105-108.
- [3] ZHANG W R, ZHANG B, LIU B W, et al. Apigenin induction of p53-independent apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer [J]. Chin J Clin Oncol(中国肿瘤临床), 2013, 40(3): 134-139.
- [4] WANG H D, LIU A L, DU G H. New progress in the pharmacology of apigenin [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2008, 17(18): 1561-1565.
- [5] XIA L B, LI B, DONG S R, et al. Studies on separation and purification of flavonoid aglycone from Flos Genkwa by macroporous adsorption resin [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(17): 13-16.
- [6] LI Y N, YIN L H, XU L N, et al. A simple and efficient protocol for largescale preparation of three flavonoids from the flower of *Daphne genkwa* by combination of macroporous resin and counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2010(33): 2168-2175.

收稿日期: 2014-04-10

快速鉴别药品中组胺类降压物质

肖贵南, 孙清萍, 程朝辉(广东省食品药品检验所, 广州 510180)

摘要: 目的 探讨快速鉴别药品中降压物质的可行性。方法 应用偶氮试验法对药品中的组胺和组胺类物质进行快速显色鉴别, 结果与中国药典 2010 年版的“降压物质检查法”进行验证比较。结果 组胺对照品呈现明显的阳性反应, 其检测灵敏度为 0.125 μg , 2 种方法的检查结果一致。结论 所建立的方法为降压物质药害应急事件的处理提供了一种新的思路。

关键词: 组胺; 降压物质; 鉴别; 偶氮试验

中图分类号: R917.7

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)01-0059-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.015

Rapid Identification of Histamine-like Depressor Substances in Drugs

XIAO Guinan, SUN Qingping, CHENG Zhaohui(Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the feasibility of rapid identification of depressor substances in drugs. **METHODS** Method of azo test was applied to identify histamine and histamine like substances in drugs quickly, the result was compared with that of routine method indexed in Chinese Pharmacopeia. **RESULTS** Control substance of histamine showed positive reaction, the detectability of this method was 0.125 μg , it had good correlation between this new method and routine method. **CONCLUSION** It provides a new way to deal with the drug emergency induced by depressor substances.

KEY WORDS: histamine; depressor substances; identification; azo test

药品中的降压物质主要是指组胺等能引起血压下降的生物胺类物质,其含量超过规定的限度时^[1],临床上可引起生物个体出现血压下降、冷汗

甚至休克等症状。基于猫为实验对象的降压物质检查法作为质量控制标准方法已收载于中国药典 2010 年版^[2],但由于耗时较长,且需用到专门设

基金项目: 广东省食品药品监督管理局药检系统课题(YJ201036)

作者简介: 肖贵南,男,硕士,主任药师,硕士 Tel: 13802540936

E-mail: gzxgn@163.com

备,不利于药害事件中药品的快速应急检验。为此本实验建立了一种新型的偶氮试验快速鉴别方法,并与法定的降压物质检查法进行了比较,为相关药害事件的快速应急处理提供一种新思路。

1 仪器与试剂

BL-420F 生物机能系统(成都泰盟生物科技有限公司);聚四氟乙烯(PTFE)滤纸(北京诚信膜科技发展有限公司)。

磷酸组胺对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:150510-200412,规格:25 mg·支⁻¹);氯化钠注射液(贵州天地药业有限责任公司,批号:A13031202,规格:250 mL:2.25 g);对氨基苯磺酸、亚硝酸钠、氢氧化钠、盐酸等均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 试剂的配制

2.1.1 偶氮试剂的配制 试剂 A 的配制:称取一定量的对氨基苯磺酸溶解于 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,配制成浓度为 0.5%的溶液。

试剂 B 的配制:分别配制 5% NaNO₂ 水溶液和 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液,临用前等体积混合。

2.1.2 组胺对照品溶液的配制 精密称取一定量的磷酸组胺,换算成含组胺的量,以氯化钠注射液依次稀释成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3, 0.15, 0.10, 0.05 μg·mL⁻¹ 系列浓度的组胺对照品溶液。

2.2 检测方法

2.2.1 原理 在弱酸性条件下,亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后,再与样品中组胺类物质耦合生成肉眼可见的橙红色偶氮化合物。

2.2.2 操作过程 在反应滤纸上,加入待测样品溶液 1 滴(约 50 μL),加入碱化的 0.5%对氨基苯磺酸试剂 1 滴(约 50 μL),1 min 后再加入临用前配制的 5% NaNO₂ 与 1 mol·L⁻¹ HCl 混合溶液 1 滴(约 50 μL),2 min 左右查看显色结果,若呈现红色则判为阳性反应,无色或轻微黄色则为阴性反应。

2.3 对氨基苯磺酸的最佳浓度选择

以 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液配制不同浓度的对氨基苯磺酸溶液(浓度分别为 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%),按“2.2”项下方法对浓度为 10, 5, 2.5 μg·mL⁻¹ 组胺对照品溶液进行鉴别检查(给药体积均约为 50 μL)。由 3 人进行重复性试验,结果显示各浓度下的对氨基苯磺酸溶液对于 3 个浓度组胺对照品溶液均具有一定显色效果,浓度≥0.5%的对氨基苯磺酸显色效果基本相同,均

要优于浓度≤0.25%的对氨基苯磺酸显色效果,正式鉴别试验时采用 0.5%对氨基苯磺酸溶液作为显色剂。结果见表 1。

表 1 不同浓度的显色剂试验结果

Tab. 1 Test results of chromogenic agent under different concentrations

组别	组胺浓度/ μg·mL ⁻¹	不同浓度对氨基苯磺酸溶液的显色反应结果					
		2%	1%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%
A 结果	10	++	++	++	+	+	+
	5	++	++	++	+	+	+
	2.5	++	++	++	+	+	±
B 结果	10	++	++	++	+	+	+
	5	++	++	++	+	+	±
	2.5	++	++	++	+	+	±
C 结果	10	++	++	++	+	+	+
	5	++	++	++	+	+	+
	2.5	++	++	++	+	+	±

注:±表示可疑阳性反应;+, ++表示强度递增的阳性反应。

Note: ± represented suspicious positive reaction; +, ++ represented the increasing intensity of positive reaction.

2.4 检测灵敏度试验

以 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液配制浓度分别为 0.5%和 0.25%的对氨基苯磺酸溶液,配制系列浓度的组胺对照品溶液(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3, 0.15, 0.10, 0.05 μg·mL⁻¹),按“2.2”项下方法进行鉴别检查(给药体积均约为 50 μL),3 人次进行重复性试验,结果表明 10, 5, 2.5 μg·mL⁻¹ 组胺溶液均可显色(样品量为 50 μL),且在同等条件下,使用 0.5%对氨基苯磺酸的最终显色效果优于 0.25%对氨基苯磺酸,2 人次的结果还检出了 1.25 μg·mL⁻¹ 组胺对照品溶液;表明在最优条件下,该方法的最低检测限<2.5 μg·mL⁻¹ (给药体积均约为 50 μL),即组胺检出灵敏度>0.125 μg。结果见表 2。

2.5 样品中降压物质的常规检查与快速显色鉴别的对比

中国药典 2010 年版收录的“降压物质检查法”是规定在猫灵敏度合格的前提下,比较样品的检查剂量(质量标准中具体规定)与组胺对照品(剂量为 0.1 μg·kg⁻¹)引起的血压下降情况^[2]。取 9 批需要进行降压物质检查的样品(包括氨基酸注射液 3 批、盐酸阿柔比星 3 批、参芪扶正注射液 3 批),进行降压物质的常规检查,结果均为符合规定(猫体质量为 3.0 kg,其灵敏度检查均符合规定)。同时设立氯化钠注射液和 0.2 μg·kg⁻¹ 组胺分别作为

表 2 检测灵敏度试验结果

Tab. 2 Results of test for detection limit

组别	对氨基苯磺 酸浓度/ %	不同浓度组胺对照品溶液的显色反应结果/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$								
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.3	0.15	0.10	0.05
A	0.5	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	0.25	+	+	+	-	-	-	-	-	-
B	0.5	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	0.25	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C	0.5	++	++	++	-	-	-	-	-	-
	0.25	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注: -表示阴性反应; +, ++表示强度递增的阳性反应。

Note: - represented negative reaction; +, ++ represented the increasing intensity of positive reaction, respectively.

阴性和阳性对照。结果, 阳性对照产生的降压幅度明显超过 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胺对照溶液的降压幅度(对照品产生的降压幅度记为 dS, 供试品溶液产生的降压幅度记为 dT), 判为不符合规定; 而氯化钠注射液及其他各组样品的 dT 均小于相应的 dS, 判为降压物质符合规定的限度。

取上述 9 批样品, 按“2.2”项下方法进行偶氮鉴别检查, 考虑到本法检测灵敏度 $\geq 0.125 \mu\text{g}$; 显色鉴别时需要结合常规试验使用的猫体质量来确定配制的组胺对照品溶液浓度(3.0 kg 猫对应的常规试验组胺对照品检查剂量为 $0.3 \mu\text{g}$; 因而在供试品溶液体积为 $50 \mu\text{L}$ 前提下, 对应于偶氮试验的 $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组胺对照品溶液能否产生红色反应, 这个剂量在本方法的检测灵敏度范围内)。同时设立氯化钠注射液和 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胺分别作为阴性和阳性对照。结果表明, $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组胺能产生明显的红色反应, 而其他各组均为阴性反应。

上述结果表明: 2 种检查或鉴别方法得出的最终结果完全一致。

2.6 组胺加样回收鉴别试验

取“2.5”项下的样品, 分别添加并配制成含终浓度为 $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组胺对照品溶液的供试品溶液, 另取一只猫按照中国药典 2010 年版附录方法进行常规降压物质检查(猫体质量为 2.5 kg , 供试品溶液注射体积为 $1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对应于添加组胺的最终剂量为 $0.5 \mu\text{g}$)。考虑到进行降压物质检查时所添加的 $0.5 \mu\text{g}$ 组胺对应于偶氮试验的组胺对照品溶液的检查浓度为 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (供试品溶液体积为 $50 \mu\text{L}$), 因而同步进行偶氮试验时配制成含终浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组胺供试品溶液, 看能否产生红色反应。

结果每组样品在进行上述处理后, 偶氮试验

结果均呈阳性红色反应, 而常规法定检查结果均判为不符合规定, 两者结果一致, 表明添加组胺对照品物质不会干扰这 2 种方法的样品检查。

2.7 新方法的推广应用

取日常检验中常规需要进行降压物质检查的 62 批样品(由于缺乏阳性样品, 其中 10 批阴性样品添加组胺对照品溶液作为混合样品进行相应检查), 同时设立阴性和阳性对照组, 参照“2.6”项下添加浓度和方法进行 2 种方法的对比研究(常规猫降压物质检查的对照品组胺剂量为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 偶氮试验中, 不同体质量的猫对应于不同浓度的组胺对照品溶液, 显色剂和供试品溶液体积均为 $50 \mu\text{L}$)。

结果 52 批样品经过 2 种方法检查得出的结果高度一致(符合规定或阴性反应); 另外 10 批阴性样品添加组胺对照品溶液作为混合样品进行相应检查后, 进行常规降压物质检查时 dT 均大于相应的 dS, 判为降压物质不符合规定的限度, 而偶氮试验结果均呈现明显的阳性反应, 两者最终判断结果一致。

3 讨论

现行降压物质检查方法主要有采用猫的“降压物质检查法”和豚鼠回肠肌进行的“组胺类物质检查”^[2], 存在使用动物、检查时间偏长、需用到专门设备等不足之处, 不符合动物实验的 3R 原则(优化、减少、替代), 也不利于降压物质损害事件的快速应急处理。

根据组胺类物质可与对氨基苯磺酸和酸化的亚硝酸盐反应生成红色偶氮化合物的现象, 建立了降压物质的快检方法, 同时与法定的降压物质检查方法进行了对比研究, 结果两者具有高度的吻合性。所建立的方法, 常温下反应迅速

(3~5 min)、试剂轻便易携,不需要特殊仪器设备,适合于药害事件的快速应急检验。

在反应介质的选取方面,试验了几种不同滤纸,结果亲水性和疏水性滤纸效果基本一样,考虑到有酸碱参与反应,最终选择 PTFE 滤纸作为反应介质。研究表明,先加对氨基苯磺酸的显色效果要优于先加酸化的亚硝酸盐的显色效果。本法直接采用安全的氨基苯磺酸钠进行重氮化反应,相对于具有致癌性的对硝基苯胺重氮化显色等方法具有明显的优势^[3-5],由于实践中缺乏常规检验呈阳性的样品,目前只能以阴性样品添加组胺对照品进行回收试验和验证,事实证明添加组胺不会干扰样品的降压物质检查和显色检查。

本实验所建立的方法为降压物质药害事件的

快速应急检验提供了一种新的思路。目前国内外未见该方法用于降压物质快速鉴别的公开文献报道。

REFERENCES

- [1] LIU H. Study on the depressor substance test of Clindamycin Phosphate injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(3): 306-308.
- [2] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 103, 214-215.
- [3] HAO H L. Study on method for determination of histamine in aquatic products [J]. Food Sci(食品科学), 2000, 21(8): 46-48.
- [4] ZHU W H, ZHOU D Q. An improved method for determination of histamine in canned fish by spectrophotometry [J]. Food Sci Tech(食品科技), 2008, 34(1): 223-225.
- [5] LIU C Q, WANG X C, DING Z P. Determination of biogenic amines in aquatic products [J]. J Shanghai Fisheries University(上海水产大学学报), 2007, 16(4): 357-361.

收稿日期: 2014-04-25

替加氟有关物质的色谱-质谱结构鉴定

王敏, 金婵, 卢萍, 丁娅, 杭太俊* (中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

摘要: 目的 采用色谱-质谱联用技术鉴定替加氟有关物质, 为其工艺和质量控制提供参考依据。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶的填充剂, 流动相为乙腈-甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲溶液, 对替加氟有关物质进行分离; 采用电喷雾正离子化-飞行时间质谱法测定各有关物质的准确质量, 三重四极杆质谱测定子离子特征, 并经解析鉴定各杂质结构。结果与结论 替加氟与其有关物质分离良好, 检测出 4 个主要有关物质均为替加氟合成的起始原料, 是母核基本未发生变化, 仅 5 位被不同基团取代的衍生物。

关键词: 替加氟; 有关物质; 色谱-质谱联用

中图分类号: 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)01-0062-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.01.016

Identification of the Related Substances in Tegafur with Hyphenated Techniques

WANG Min, JIN Chan, LU Ping, DING Ya, HANG Taijun* (Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the related substances in tegafur by hyphenated techniques for its manufacturing process and quality control. **METHODS** A column packed with the octadecyl silane chemically bonded silica was used for the separation of the related substances with a mixture of acetonitrile-methanol and 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate buffer solution as the mobile phase by isocratic elution. The structures of the related substances were speculated and identified by electrospray positive ionization LC-TOF/MS accurate ion mass and MS/MS determination and elucidation. **RESULTS & CONCLUSION** Tegafur and the related substances are separated under the established HPLC condition. Four related substances in tegafur are characterized by hyphenated techniques. Their structures are elucidated as the different substituents having the same frame structure as tegafur and starting material.

KEY WORDS: tegafur; related substances; LC-MS/MS

作者简介: 王敏, 女, 硕士生 Tel: 15365079719 E-mail: wangmin100166@163.com
Tel: (025)83271090 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

*通信作者: 杭太俊, 男, 博士, 教授, 博导