

## 注射用七叶皂苷钠质量分析

李苗, 叶小敏, 宋敏, 李娟, 冯彦利, 黄慧芬, 吕桦, 聂小春

(武汉市食品药品检验所, 武汉 430012)

**摘要** 目的:通过对 2010 年全国药品生产及流通领域的注射用七叶皂苷钠的质量进行考察分析,评价本品的质量现状及存在问题。方法:将法定检验与探索性研究相结合。针对法定检验项目不全等问题,采用 HPLC 法进行有关物质、含量测定和构型比例的测定;对构型比例不同的样品进行药效学、刺激性等药理学指标的研究;采用气相色谱法测定残留溶剂和大孔树脂残留物;采用卡氏法测定水分;采用凝胶色谱法考察高分子杂质;采用近红外光谱扫描法建立近红外光谱库,为快速检验提供依据。并对法定检验及探索性研究的结果进行统计分析。结果:法定检验与探索性研究结果之间存在显著差异。结论:探索性研究结果表明法定标准存在较多缺陷,应采用更专属、准确、灵敏的方法全面控制产品质量。

**关键词**:注射剂;七叶皂苷钠;质量分析;法定检验;探索性研究

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)10-1868-05

## Quality analysis of sodium aescinate for injection

LI Miao, YE Xiao-min, SONG Min, LI Juan, FENG Yan-li,  
HUANG Hui-fen, LV Hua, NIE Xiao-chun

(Wuhan Institute for food and Drug Control, Wuhan 430012, China)

**Abstract Objective:** To evaluate the current quality situation and problems of sodium aescinate for injection by testing and analyzing 150 batches of samples collected from drug manufacture and market all over China in 2010. **Methods:** To combine the legal test with exploratory research. To establish testing methods for assay, related substances and proportion of different isomers by HPLC as the supplement for the legal drug specification which is short of testing items and methods; to research the efficacy and irritation of products with different proportion isomers; to determine residues of organic solvents and macroporous adsorptive resin by GC; to determine water content by Karl-Fisher method; to determine macromolecule impurities by gel chromatography and establish NIR spectrum database as the foundation for instant test; to comply statistical analysis for the results of legal test and exploratory research. **Results:** There are obvious differences between the results of legal test and exploratory research. **Conclusion:** The results of exploratory research demonstrates that many defects exist in the legal drug specifications, and a series of exclusive, accurate, and sensitive methods should be established to fully control the quality of sodium aescinate for injection.

**Key words:** injection; sodium aescinate; quality analysis; legal test; exploratory research

七叶皂苷钠是一种消肿抗炎药,具有抗渗出及增加静脉张力、消肿、抗炎和改善血液循环的作用。注射用七叶皂苷钠临床上主要用于各种病因引起的脑水肿、创伤或手术所致肿胀,也用于静脉回流障碍性疾病。七叶皂苷钠与甘露醇等抗渗出降水肿药物相比,使用后无破坏电解质平衡、反弹、血尿等副作用,

临床应用越来越广泛。有关七叶皂苷钠已有较多报道,如文献[1~10]。

七叶皂苷钠最早由德国马博士大药厂从欧马栗种子中提取得到。国产七叶皂苷钠由与欧马栗同属的七叶树科植物——天师栗的干燥成熟种子娑罗子中提取得到,是一类结构相似的三萜皂苷钠盐混合

物,七叶皂苷钠 A、七叶皂苷钠 B、七叶皂苷钠 C 和七叶皂苷钠 D 为其主要成分。4 个组分互为异构体(见图 1),分子式  $C_{55}H_{85}NaO_{24}$ ,相对分子质量为 1152。七叶皂苷钠 A 和七叶皂苷钠 B 为  $\beta$  构型,七叶皂苷钠 C 和七叶皂苷钠 D 为  $\alpha$  构型。文献报道  $\beta$  构型为主要活性成分,其刺激性也相应较大<sup>[1]</sup>。本文通过对 2010 年全国药品生产及流通领域的注射用七叶皂苷钠的质量进行考察分析,评价本品的质量现状及存在问题。

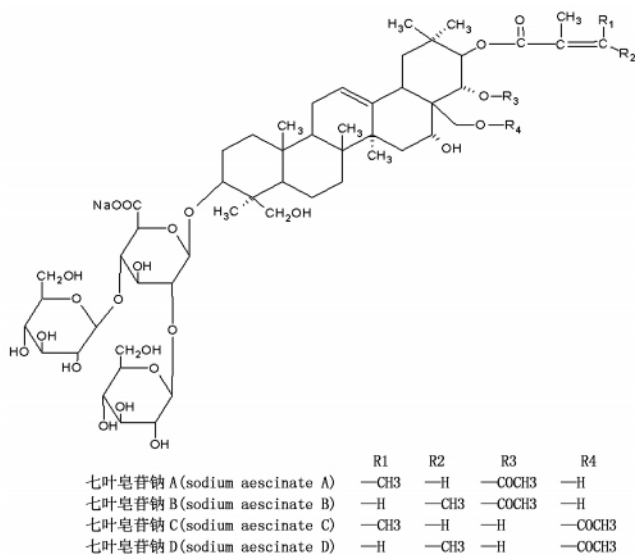


图 1 七叶皂苷钠结构式

Fig 1 Structures of sodium aescinate

### 1 样品收集

收集到的注射用七叶皂苷钠样品共 150 个批次,涉及全国 77.8% 的生产企业,64.1% 的批准文号,75% 的规格。

### 2 按标准检验情况

样品共涉及 5 个法定标准,但检查项目较少,未控制有关物质、水分与含量均匀度等检查项目;采用碱水解-酸滴定法测定总皂苷量来作为七叶皂苷钠的含量,不能反映有效成分七叶皂苷钠 A、B、C、D 的含量及  $\beta$  构型的比例。

照法定标准检验,合格率高。但在 300 nm 波长处的吸光度检查结果显示,52% 的样品吸光度为 0.07% ~ 0.09%,13.3% 的样品吸光度为限度值 0.10,数据普遍偏高(见图 2);装量差异全部合格,但部分批次样品间的差异非常大,而现行含量测定方法无法进行含量均匀度的检查。

### 3 探索性研究

#### 3.1 有关物质、含量测定与构型比例

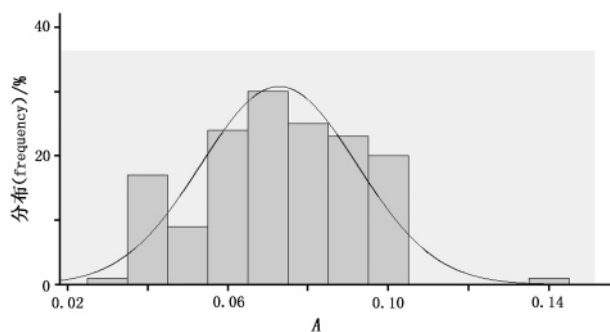


图 2 全部样品吸光度检查数据分布

Fig 2 Data scattering of all samples' absorbance

**3.1.1 仪器与试剂** 采用美国戴安 ULTIMATE 3000 型高效液相色谱仪;美国 Alltech ELSD-2000 型蒸发光散射检测器。七叶皂苷钠对照品由中国食品药品检定研究院提供,批号为 200402-100346;乙腈为美国 TEDIA 公司生产的色谱纯试剂,三氟乙酸为国药集团生产的分析纯试剂,试验用水为 Millipore 超纯水机制去离子水;样品为全部 150 批注射用七叶皂苷钠。

#### 3.1.2 实验方法

采用 Phenomenex 公司 Luna(2)  $C_{18}$  色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5  $\mu$ m),以 0.05% 三氟乙酸溶液-乙腈(64 : 36) 为流动相,流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。Alltech ELSD-2000 检测器<sup>[2]</sup>,漂移管温度:110  $^{\circ}$ C;载气为空气,流速:2.5 L · min<sup>-1</sup>;撞击器:关。

取注射用七叶皂苷钠内容物混匀,精密称取适量,加 36% 乙腈溶液溶解并制成每 1 mL 约含七叶皂苷钠 2.5 mg 的溶液作为供试品溶液。

取七叶皂苷钠对照品适量,用 36% 乙腈溶液溶解并稀释成每 1 mL 分别含七叶皂苷钠 1.25 mg、2.5 mg、5.0 mg 的系列对照品溶液。

以七叶皂苷钠 A、B、C、D 峰面积的和为七叶皂苷钠响应值,用归一化法计算有关物质的量;以七叶皂苷钠 A、B、C、D 峰面积的和取对数,与浓度的对数进行回归,以标准曲线法计算七叶皂苷钠 A、B、C、D 的总含量;以七叶皂苷钠 A、B 峰面积的和与七叶皂苷钠 C、D 峰面积的和的比值,计算  $\beta$  与  $\alpha$  构型的比例(见图 3)。

**3.1.3 实验结果** 对全部 150 批次样品进行测定,有关物质的归一化结果为 2.7% ~ 20.9%,RSD 为 53%;七叶皂苷钠 A、B、C、D 总含量离散性较大,与法定检验含量测定结果差异显著; $\beta$  与  $\alpha$  构型比例的测定结果为 0.79 ~ 4.39,RSD 为 30%(见图 4)。

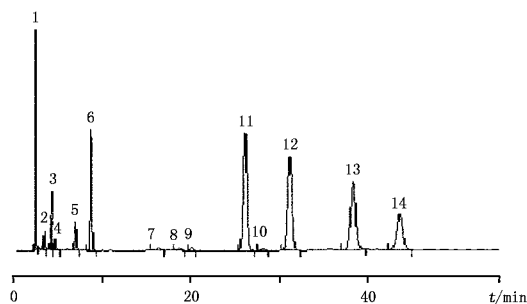


图3 样品色谱图

Fig 3 The system chromatogram of samples

1. 三氟乙酸钠 (sodium trifluoroacetate) 2~10. 有关物质 (related substances) 11. 七叶皂苷钠 A (sodium aescinate A) 12. 七叶皂苷钠 B (sodium aescinate B) 13. 七叶皂苷钠 C (sodium aescinate C) 14. 七叶皂苷钠 D (sodium aescinate D)

**3.1.4 结果分析** 采用 LC-MS 对本品的有关物质做进一步分析,样品中检出的杂质数量大幅增加(见图5),表明注射用七叶皂苷钠中的有关物质非常复杂,且主要杂质的分子离子峰与七叶皂苷钠相近,可能为与七叶皂苷钠结构相似的三萜皂苷化合物。

探索性研究以平均装量计算七叶皂苷钠 A、B、C、D 总含量,法定检验以每支中的总皂苷量计含量,因此二者差异较显著。由于中国食品药品检定研究院目前提供的七叶皂苷钠对照品仅标示了七叶皂苷钠 A 和 B 的含量,无七叶皂苷钠 A、B、C、D 单体,如能得到 4 个成分的单体为对照品分别计算含量,则方法的准确性更高。

还可用于含量均匀度的检查,用来控制每支中主要成分的量。

而不同批次样品间构型比例差异较大,表明生产企业的原料来源或生产工艺不同,可能导致本品在临床疗效上存在较大差异。

**3.2 不同构型比例样品的药理学研究**

**3.2.1 实验方法** 选取  $\beta$  与  $\alpha$  构型比例典型不同的样品进行药效、刺激性、毒性等药理学方面的研究:①选用二甲苯导致的小鼠耳肿胀模型进行抗水肿的药效学比对;②照体外溶血试验指导原则进行溶血效果比对;③采用小鼠尾静脉注射,连续给药 8 d 后取血测定其中的血红蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、肌酐和尿素氮,并对肝、肾、脾脏和尾静脉的病理切片进行分析,综合评价不同样品导致的血管刺激性、体内溶血性和毒性。

**3.2.2 实验结果** 药理实验结果表明七叶皂苷钠

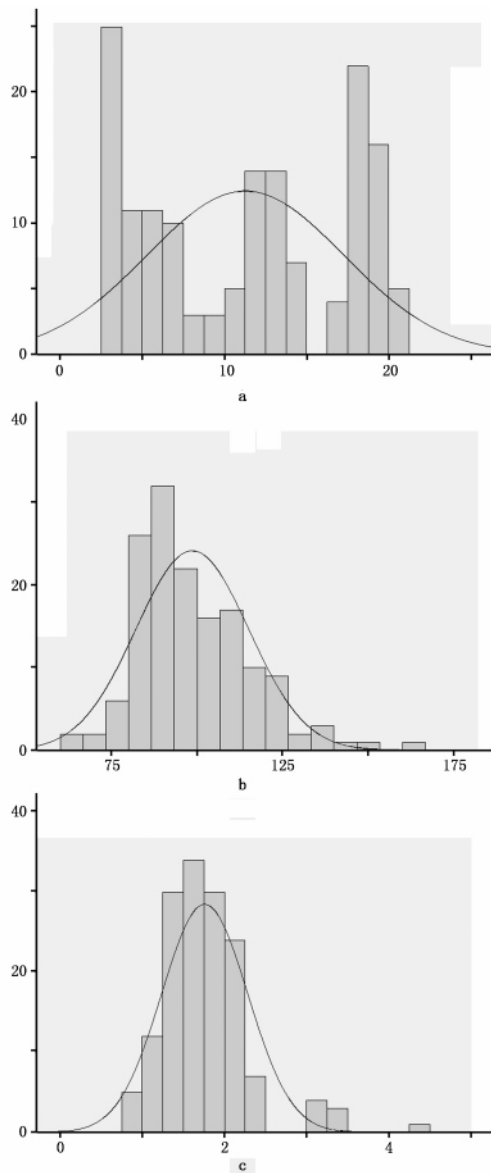


图4 探索性研究结果分布

Fig 4 The results scattering of exploratory research

a. 有关物质 (related substance) b. 七叶皂苷钠 A、B、C、D 总含量 (total contents of sodium aescinate A, B, C and D) c.  $\beta$  与  $\alpha$  构型比例 (proportion of  $\beta$  and  $\alpha$  isomers)

的抗肿胀效果与其  $\beta$  构型含量正相关;溶血性、血管刺激性、肝毒性、肾毒性、脾毒性与其  $\beta$  构型含量不相关。

**3.2.3 结果分析**  $\beta$  与  $\alpha$  构型比例不同的样品在疗效上确实存在较大差异,且毒性可能不由  $\beta$  构型产生。

**3.3 残留溶剂及大孔树脂残留物**

**3.3.1 实验方法** 根据原料生产企业提供的生产工艺,采用气相色谱法测定注射用七叶皂苷钠中的残留溶剂及大孔树脂残留物。以聚乙二醇(PEG-

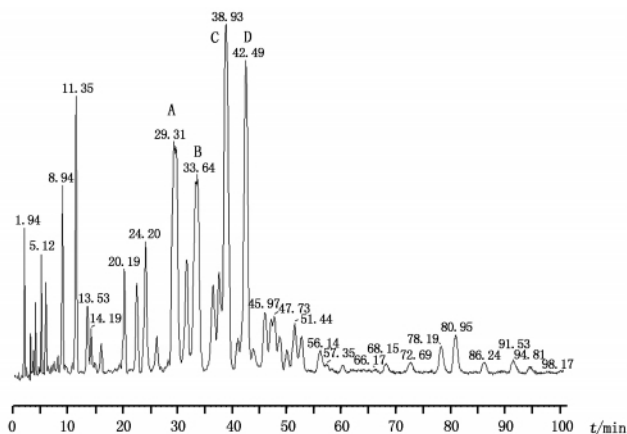


图5 样品 LC-MS 总离子流图

Fig 5 Total ion current chromatogram of LC-MS for sample

20M) (或极性相近) 为固定液; 起始温度为 50 °C 维持 2 min, 以每分钟 12 °C 的速率升温至 80 °C, 再以每分钟 15 °C 的速率升温至 180 °C 维持 2 min; 检测器温度为 250 °C; 进样口温度为 170 °C, 分流比为 5 : 1; 顶空瓶平衡温度为 80 °C, 平衡时间为 30 min。见图 6。

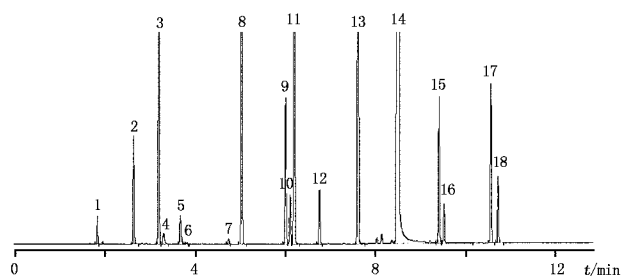


图6 残留溶剂及大孔树脂残留物分离色谱图

Fig 6 The system chromatograms of residues of organic solvents and macroporous adsorptive resin

1. 正己烷(*n*-hexane) 2. 丙酮(acetone) 3. 乙酸乙酯(ethyl acetate) 4. 甲醇(methanol) 5. 乙醇(ethanol) 6. 苯(benzene) 7. 三氯甲烷(chloroform) 8. 甲苯(toluene) 9~12. 二甲苯(xylene) 13. 苯乙烯(styrene) 14. DMF 15~18. 二乙烯苯(divinylbenzene)

**3.3.2 实验结果** 被检 13 家企业的 30 批样品中, 均不同程度的检出了残留溶剂(见表 1)。根据中国药典 2010 年版二部附录 VIII P 残留溶剂测定法的要求, 除苯乙烯无限度, 无法判断外, 有 50% 样品中的正己烷超出限度, 其他检出的有机溶剂均合格。

**3.3.3 结果分析** 全部被检企业的样品中均存在不同种类的残留溶剂和大孔树脂残留物。由于注射用七叶皂苷钠在生产中均未使用有机溶剂和大孔树脂, 表明部分原料药生产企业对大孔树脂残留物的控制不严。

表 1 有机溶剂残留探索性研究结果  
Tab 1 The results of exploratory research for residual solvents

有机溶剂 (organic solvent)	检出企业 (the number of corporations)
苯乙烯(styrene)	2
甲醇(methanol)	2
二甲苯(xylene)	5
三氯甲烷(chloroform)	5
丙酮(acetone)	7
乙酸乙酯(ethyl acetate)	10
甲苯(toluene)	11
乙醇(ethanol)	12
正己烷( <i>n</i> -hexane)	13

### 3.4 水分

**3.4.1 实验方法** 本品为冻干粉针, 故采用卡氏水分测定法对部分样品的含水量进行考察。

**3.4.2 实验结果** 10 批样品的水分测定结果为 6.2% ~ 12.0%, 表明不同企业间的生产工艺差异较大, 导致本品的含水量有显著差异。

### 3.5 高分子杂质

**3.5.1 实验方法** 本品为天然植物提取物, 可能存在胶质、多糖、霉菌蛋白等高分子物质。采用 TSK GEL 2000SWXL 柱, 以人胰岛素(相对分子质量 5800)为对照, 采用 UV(214 nm)、RI 双检测器连用系统对部分样品中的高分子杂质进行考察。

**3.5.2 实验结果** 被考察的样品中均未检出分子量大于七叶皂苷钠的高分子物质, 其 UV、RI 图谱基本一致。表明被检样品中不含高分子物质或高分子物质含量偏低, 有待下一步采用更适宜、更灵敏的检测条件进行深入研究。

### 3.6 近红外分析

**3.6.1 实验方法** 采用德国布鲁克公司 Bruker Matrix-F 型傅里叶变换近红外光谱仪, 配有 InGaAs 检测器, 外接光纤, 波数范围 12000 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 8  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 64 次采集近红外光谱。通过一阶导数化和矢量归一化对光谱进行预处理, 应用马氏距离方法建立质量鉴别一致性检验模型。

**3.6.2 实验结果** 将本次抽样较多且规模较大的企业的样品图谱进行分析, 其中 4 家企业的样品光谱图经处理后一致性较好, 可与其他企业样品的数

据完全区分。

#### 4 总结

##### 4.1 总体评价

通过对注射用七叶皂苷钠进行质量分析,可发现以下两方面的问题:一、现行法定标准缺项较多,需进行完善提高;二、本品 $\beta$ 与 $\alpha$ 构型的比例差异大,导致临床疗效差异较大;装量、水分差异大,反映企业的生产工艺不稳定,生产水平不高;有关物质含量高,大孔树脂残留物超标,存在较大的用药风险。

##### 4.2 建议

**4.2.1 深入研究** 七叶皂苷钠是一类结构相似的三萜皂苷钠盐混合物,除主要成分七叶皂苷钠A、B、C、D外,应对其他三萜皂苷钠盐的化学结构、理化性质及药理作用等进行深入研究,并通过提高原料药的生产工艺,对其在原料及制剂中的比例进行严格控制。在研究充分的基础上,可考虑修订本品的处方,以有效成分七叶皂苷钠A、B、C、D的总量替代总皂苷量作为规格,确保该品种临床用药安全有效。

**4.2.2 提高标准** 在法定标准的基础上增加有关物质、构型比例、含量均匀度、水分等检查项目;相应提高七叶皂苷钠原料药的质量标准,特别是应增订残留溶剂等检查项目。还应修订含量测定方法,以HPLC法测定有效成分七叶皂苷钠A、B、C、D的总含量。

**4.2.3 提高工艺** 原料药生产企业应规范娑罗子药材的采收程序,明确种属、产地及季节,保证七叶皂苷钠原料药成分及比例稳定;立即改进生产工艺,提高原料药的纯度,并控制有机溶剂和大孔树脂残留物,确实保证原料药安全有效。

注射液生产企业应优化生产条件、细化工艺参数,提高生产稳定性,保证本品质量的均一性。

#### 参考文献

1 Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic

profile. *Pharmacolog Res* 2001, 44(3):183

- 2 LI Jing(李菁), YE Wen-cai(叶文才). Application of HPLC-ELSD on quality control of aescin for injection (HPLC-ELSD法在注射用七叶皂苷钠质量控制中的应用). *J Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2000, 31(8):582
- 3 LIN Hong(林红), TIAN Song-jiu(田颂九), CHEN Wen-cheng(陈文程). HPLC determination of sodium aescinate A and B in sodium aescinate for injection (HPLC法测定注射用七叶皂苷钠中七叶皂苷A和B的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(12):1443
- 4 HU Xia-min(胡霞敏), ZENG Fan-dian(曾繁典). Study on ELISA method for determination of sodium  $\beta$ -aescinate concentration in plasma( $\beta$ -七叶皂苷钠血浆药物浓度ELISA测定方法的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2006, 26(9):1229
- 5 WANG Xiang-hong(王祥洪), YANG Ji-dong(杨季冬), LIU Shao-pu(刘绍璞). Fading spectrophotometric method for the determination of sodium aescinate(褪色分光光度法测定七叶皂苷钠). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(1):41
- 6 ZHANG Wei(张伟), ZHAI Guo-song(翟国松), LIU Lin-jie(刘琳婕) *et al.* Investigation on quality control of sodium aescinate capsules(七叶皂苷钠胶囊的质量控制). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(1):104
- 7 ZHOU Juan(周娟), WANG Xiang-hong(王祥洪). Resonance rayleigh scattering method for the determination of sodium aescinate with crystal violet(结晶紫共振瑞利散射法测定七叶皂苷钠). *J Chongqing Norm Univ(Nat Sci)*(重庆师范大学学报自然科学版) 2008, 25(2):71
- 8 WANG Xiang-hong(王祥洪), YANG Ji-dong(杨季冬), LIU Shao-pu(刘绍璞), *et al.* Resonance rayleigh scattering method for the determination of sodium aescinate by means of night blue(夜蓝共振瑞利散射法测定七叶皂苷钠). *Chin J Appl Chem*(应用化学) 2008, 25(6):656
- 9 WANG Xiang-hong(王祥洪). Spectrophotometric method for the determination of sodium aescinate with brilliant cressy blue system(灿烂甲酚蓝体系显色光度法测定七叶皂苷钠). *J Wuhan Univ(Nat Sci Ed)*(武汉大学学报理学版) 2010, 56(1):31
- 10 WANG Xiang-hong(王祥洪), YANG Ji-dong(杨季冬), LUO Ming-li(罗明礼). Fading spectrophotometric method for determination of sodium aescinate with ethyl violet(乙基紫褪色分光光度法测定七叶皂苷钠). *Chin J Anal Lab*(分析实验室) 2008, 27(12):62

(本文于2011年3月14日收到)