

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.003

利用超高效液相色谱和离子色谱法测定注射用磷酸川芎嗪的含量*

袁 亮^{1,2} 高青山² 王 彦^{1Δ} 阎 超^{1Δ}

(上海交通大学药学院 上海 200240)

摘要 目的:建立超高效液相色谱法(UPLC)和离子色谱法(IC)测定磷酸川芎嗪中川芎嗪和磷酸的含量,为质量评价提供依据。**方法:**UPLC 测定川芎嗪的色谱柱为 Waters Acquity BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);检测波长:300 nm 检测川芎嗪,274 nm 检测有关物质邻苯二甲酸二甲酯;流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0.0~0.8 min, 10% B→90% B; 0.8~0.81 min, 90% B→10% B; 0.81~1.00 min, 10% B),流速:0.7 mL/min。IC 测定磷酸的离子交换色谱柱为 Dionex IonPac AS11-HC-4 μm (4 × 250 mm),流动相为 30 mmol/L KOH 溶液等度洗脱 15 min,流速 1.0 mL/min,柱温 35℃;电导检测器;抑制器电流为 50 mA。**结果:**川芎嗪和磷酸在 10~100 g/mL 内具有良好的线性关系,相关系数均为 1.0, UPLC 法测定川芎嗪的回收率为 102.0%。IC 测定磷酸的回收率为 99.8%。7 个公司生产的注射剂中川芎嗪的含量均在药典规定的范围 90%~110%内。但是其中 3 个公司生产的注射剂磷酸超出药典规定范围 90%~110%。**结论:**与常规 HPLC/UPLC 测定磷酸川芎嗪含量方法比较,本文所用方法测定结果更加准确、全面、且重复性好,能够真实反应注射用磷酸川芎嗪的实际含量,对于注射用磷酸川芎嗪的安全性和有效性评估提供了一定的依据。

关键词:超高效液相色谱;离子色谱;磷酸川芎嗪;川芎嗪;磷酸;含量测定

中图分类号:R917; O657.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)08-1410-06

Determination of Ligustrazine Phosphate for Injection by Ultra Performance Liquid Chromatography and Ion Chromatography*

YUAN Liang^{1,2}, GAO Qing-shan², WANG Yan^{1Δ}, YAN Chao^{1Δ}

(School of Pharmacy Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method based on ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) and an ion chromatography (IC) for analysis of ligustrazine and phosphoric acid, providing the basis for their qualitative evaluation. **Methods:** Ligustrazine was separated on Waters Acquity BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm). The detection wavelengths were 300 nm for ligustrazine and 274 nm for dimethyl phthalate. Mobile phase A was 0.1% formic acid in water and B was 0.1% formic acid in acetonitrile with gradient elution (0.0~0.8 min, 10% B→90% B; 0.8~0.81 min, 90% B→10% B; 0.81~1.0 min, 10% B). The flow rate was 0.7 mL/min. Phosphate anion was separated on Dionex IonPac AS11-HC-4 μm column (4 mm × 250 mm). Equivalent diluted with 30 mmol/L KOH for 15 minutes. The flow was 1.0 mL/min. Column temperature was 35 °C. The conductivity detector suppressor current was 50 mA. **Results:** Ligustrazine and phosphoric acid had good linearity in the range of 10~100 g/mL and both of the correlation coefficients were 1.0. The recoveries of UPLC method for ligustrazine was 102.0%. The recoveries of IC method for phosphoric acid was 99.8%. The obtained results of the 7 companies' injections of ligustrazine phosphate are all in pharmacopeia range of 90%~110%. But the phosphoric acid contents in 3 companies are out of the range. **Conclusion:** Compared with the commonly used content of ligustrazine phosphate by HPLC/UPLC, the results of this method are more accurate, comprehensive and reproducible, which can truly reflect the actual content of ligustrazine phosphate in the injection. It provides a better basis for the safety and effectiveness of ligustrazine phosphate for Injection.

Key words: Ultra high performance liquid chromatography (UPLC); Ion chromatography (IC); Ligustrazine phosphate; Ligustrazine; Phosphoric acid; Content determination

Chinese Library Classification (CLC): R917; O657.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)08-1410-06

* 基金项目:上海市科委科研项目(16142200300)

作者简介:袁亮(1983-),本科,高级研究助理,主要研究方向:临床前药物分析,电话:18917123383, E-mail: yuanliang0105@163.com

Δ 通讯作者:王彦,电话:(021)38953588, E-mail: wangyan11@sjtu.edu.cn;

阎超,电话:(021)38953588, E-mail: chaoyan@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2018-08-28 接受日期:2018-09-24)

前言

注射用磷酸川芎嗪,其化学结构式为 2,3,5,6-四甲基吡嗪磷酸盐一水合物,辅料为甘露醇。临床采用静脉滴注,有 50 mg 和 100 mg 两种规格。具有抗血小板聚集的作用,并对已聚集的血小板有解聚作用。此外,尚具有扩张小动脉,改善微循环和增加脑血流量,从而产生抗血栓形成和溶血栓的作用^[1-3],近年来通过动物实验发现:川芎嗪对于 DNA 损伤、细胞凋亡、炎症均有治疗作用,川芎嗪还可以减轻和预防酒精性肝损伤^[4-13]。有研究人员对川芎嗪进行结构修饰来增强其药理活性,并开发川芎嗪新的治疗领域^[14,15]。

注射用磷酸川芎嗪现有质量标准有两个:一是国家食品药品监督管理局国家药品标准新药转正标准第 78 册,二是中国药典 2010 年版第二增补本,两个标准对于磷酸川芎嗪的含量测定方法均采用的是高效液相色谱法(HPLC),甲醇和水作为流动相,用 C18 柱进行等度洗脱测定其含量^[16,17]。此方法运行时间长,可能会残留弱极性杂质。本文建立了超高效液相色谱(Ultra-performance liquid chromatography, UPLC) 1 分钟测定川芎嗪的含量,该方法运行时间短、操作简单、专属性强、结果准确、可有效控制产品质量。另外,现有的两个标准对磷酸含量均无测试要求,但注射用磷酸川芎嗪的规格以 2,3,5,6-四甲基吡嗪磷酸盐一水合物计,所占比重分别为 2,3,5,6-四甲基吡嗪 54.0%、磷酸 38.9%、水 7.1%。所以只计算其中川芎嗪的含量来表示磷酸川芎嗪的含量并不够准确。本试验分别用 UPLC 法和离子色谱法(ion chromatography, IC)测定磷酸川芎嗪中川芎嗪和磷酸的含量。相比较于文献报道和现有的质量标准 HPLC/UPLC 测定磷酸川芎嗪含量的方法^[18-20],本方法测定结果更加准确、可靠、更能够真实反应药品中磷酸川芎嗪的实际含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 超高效液相色谱仪 Acquity UPLC, (紫外检测器为二极管阵列检测器 DAD, Waters 自动进样器, masslynx 色谱工作站) DIONEX Integrion HPIC 离子色谱仪, Dionex™ Chromeleon™ 7.2 色谱数据系统, ICS-5000+EG KOH 淋洗液发生器, 离子交换保护柱: Dionex IonPac AG11-HC-4 μm guard (4 $\times$ 50 mm), 离子交换色谱柱: Dionex IonPac AS11-HC-4 μm (4 $\times$ 250 mm), Mettler-Toledo X26 电子天平, MilliQ 纯水仪, 艾本德电子移液器, 昆山市超声仪器有限公司 KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器。

川芎嗪对照品(购买自 Sigma-Aldrich 分析标准品, 批号: 101670719 含量 98.0%(GC)), 邻苯二甲酸二甲酯对照品(购买自 Sigma-Aldrich 分析标准品, 批号: 101680092, 含量 99.5%(GC)), 甘露醇(购买自上海百灵威技术有限公司, 批号: SIS02077, 含量 98%), 磷酸根 IC 标准溶液(购买自 Sigma-Aldrich 分析标准品, 批号: BCBV4696, 含量 1000 mg/L $\pm$ 4 mg/L), 注射用磷酸川芎嗪规格为 50 mg (A 公司生产; B 公司生产; C 公司生产)。注射用磷酸川芎嗪规格为 100 mg (D 公司生产; E 公司生产; F 公司生产; G 公司生产), 乙腈(Sigma-Aldrich, HPLC 级色谱纯), 水为实验室制得去离子水, 甲酸(购买自赛默飞世

尔科技(中国)有限公司, 分析纯, 含量 98%), 其余试剂均为分析纯。

1.2 溶液的配制

1.2.1 对照品溶液的配制 精密称量川芎嗪对照品约 40.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度摇匀, 作为川芎嗪对照品贮备液(0.4 mg/mL)。精密称取邻苯二甲酸二甲酯对照品约 8.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度摇匀, 作为邻苯二甲酸二甲酯对照品贮备液(0.2 mg/mL)。临用时分别精密量取两种贮备液 25 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度摇匀, 即得对照品混合溶液(含川芎嗪浓度 0.1 mg/mL, 邻苯二甲酸二甲酯浓度 0.05 mg/mL)。

1.2.2 供试品溶液的制备 规格为 50 mg 和 100 mg 的注射用磷酸川芎嗪, 除去塑料盖和铝盖, 精密称定质量, 然后用水溶解注射剂, 用水润洗 3 遍分别转移至 50 mL 和 100 mL 的离心管。玻璃瓶连同盖橡胶塞一起放入马弗炉 100 度 30 分钟烘干, 然后盖紧橡胶盖塞, 精密称重, 减量法得注射剂总重量。样品加水稀释至刻度摇匀, 再稀释 10 倍作为供试品(0.1 mg/mL)。

1.3 色谱条件与方法学验证

1.3.1 UPLC 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity BEH C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μm); 检测波长: 300 nm 检测川芎嗪, 274 nm 检测有关物质邻苯二甲酸二甲酯; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 梯度洗脱(0.0~0.8 min, 10% B $\rightarrow$ 90% B; 0.8~0.81 min, 90% B $\rightarrow$ 10% B; 0.81~1.00 min, 10% B), 流速: 0.7 mL/min, 检测波长 300 nm, 柱温: 30℃。进样体积为 2 μL , 样品浓度 0.1 mg/mL, 在该色谱条件下, 样品中可能存在的有关物质邻苯二甲酸二甲酯(DMP)与主峰川芎嗪(TMP)分离良好。见图 1。

1.3.2 UPLC 测定川芎嗪的方法学验证 线性关系: 取川芎嗪对照品贮备液(0.4 mg/mL)用水配制成质量浓度分别为 10、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。按照上述“3.1”色谱条件下测定峰面积, 以峰面积对溶液质量浓度进行线性回归, 得到回归方程为 $y = 5341.1x + 2396.5$, $R^2 = 1$ ($n=5$), 线性范围 10~100 $\mu\text{g/mL}$, 最小检测限为 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 最小定量限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.3.3 IC 色谱条件 测定磷酸根离子, 本文所采用的方法为离子色谱。保护柱: Dionex IonPac AG11-HC-4 μm (4 $\times$ 50 mm), 分析柱: Dionex IonPac AS11-HC-4 μm (4 $\times$ 250 mm), 流动相 30 mmol/L KOH 溶液等度洗脱 15 min, 流速 1.0 mL/min, 柱温为 35℃; 电导检测器; 抑制器电流为 50 mA; 进样量为 25 μL , 在该色谱条件下, 杂质离子峰与磷酸的主峰分离良好, 无干扰。见图 2。

1.3.4 IC 测定磷酸根离子的方法学验证 线性关系: 取 1000 $\mu\text{g/mL}$ 磷酸根 IC 标准溶液配制成质量浓度分别为 10、25、50、75、100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液, 按照实验条件从低质量浓度到高质量浓度分别注入离子色谱仪, 以磷酸根阴离子的质量浓度(x)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程为 $y = 0.1026x - 0.0216$, $R^2 = 1$ ($n=5$), 线性范围 10~100 $\mu\text{g/mL}$, 最小定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$, 最小检测限为 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 。

2 结果

2.1 样品中川芎嗪的测定结果

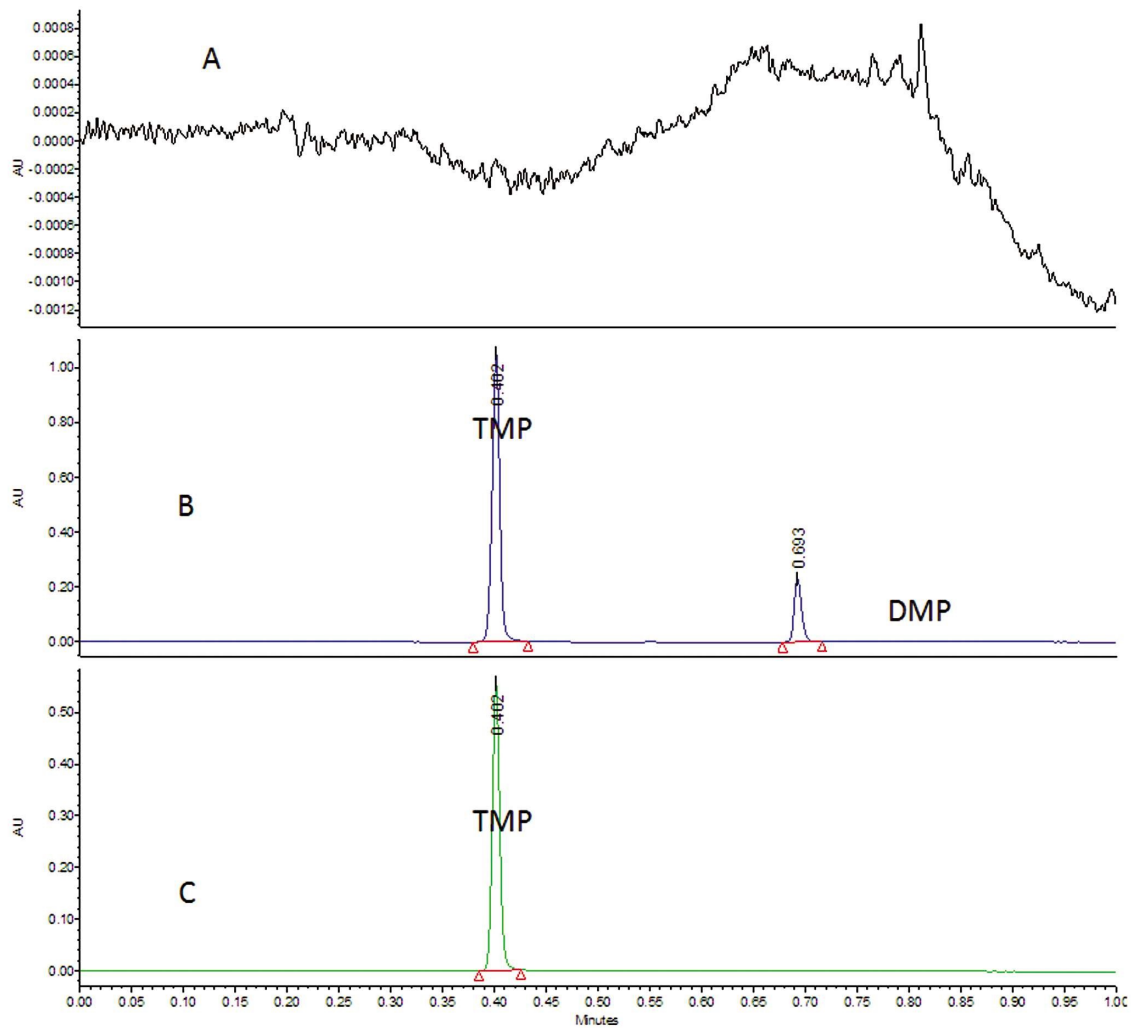


图 1 川芎嗪的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of ligustrazine

(A) 不含川芎嗪的阴性样品; (B) 川芎嗪和邻苯二甲酸二甲酯的混合对照品; (C) 供试品。

(A) negative sample without ligustrazine; (B) ligustrazine(TMP) and dimethyl phthalate (DMP) mixed reference standard; (C) sample.

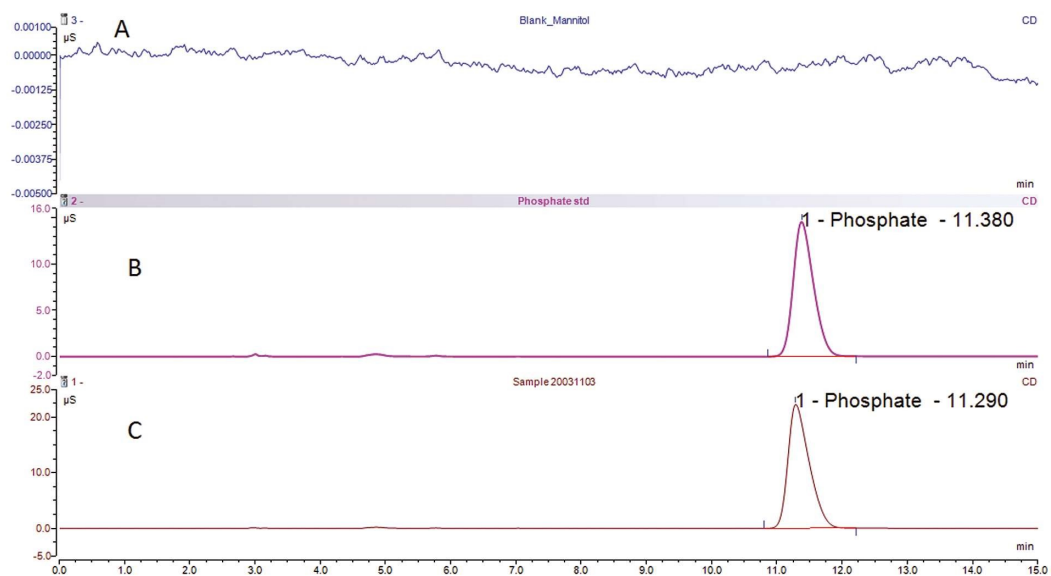


图 2 磷酸根离子色谱图

Fig. 2 IC chromatograms of phosphate anion

(A) 不含磷酸川芎嗪的阴性样品; (B) 磷酸根离子对照品; (C) 供试品。

(A) negative sample without ligustrazine phosphate; (B) phosphoric anion reference standard; (C) sample

从市场购得 7 家公司生产的注射用磷酸川芎嗪,按“1.2.2”项下供试品溶液的制备方法处理,每批平行制备 3 份,每份分别按照“1.3.1”色谱条件测定 2 次,取平均值,测得川芎嗪的含量均在药典规定范围 90~110%之内,见表 1。

表 1 7 家公司所生产的注射剂中川芎嗪的含量结果
Table 1 Ligustrazine content measured from 7 different companies

Company	Label claim /mg	Theoretical $C_8H_{12}N_2$ amount /mg	$C_8H_{12}N_2$ amount /mg	$C_8H_{12}N_2$ content /%
A	50.0	27.0	25.6	94.8
B	50.0	27.0	29.2	108.0
C	50.0	27.0	29.6	109.5
D	100.0	54.0	58.9	109.0
E	100.0	54.0	50.5	93.4
F	100.0	54.0	54.2	100.3
G	100.0	54.0	52.0	96.3

注: Theoretical $C_8H_{12}N_2$ amount = label claim $\times \frac{M_{C_8H_{12}N_2}}{M_{C_8H_{12}N_2 \cdot H_3PO_4 \cdot H_2O}} = \text{label claim} \times \frac{136.2}{252.2}$

$C_8H_{12}N_2$ content = $\frac{C_8H_{12}N_2 \text{ Amount}}{\text{Theoretical } C_8H_{12}N_2 \text{ amount}} \times 100\%$

2.2 样品中磷酸的测定结果

同样, 7 家公司生产的注射用磷酸川芎嗪, 按“1.2.2”项下供试品溶液的制备方法处理, 每批平行制备 3 份, 每份分别按照“1.3.3”色谱条件测定 2 次, 取平均值, 测得磷酸的含量。其中 3 家公司所生产的药品磷酸超出药典规定范围 90%~110%, 详见表 2。

表 2 7 家公司所生产注射剂中磷酸的含量结果
Table 2 Phosphate content measured from 7 different companies

Company	Label Claim /mg	Theoretical H_3PO_4 amount /mg	H_3PO_4 amount /mg	H_3PO_4 content /%
A	50.0	19.4	38.2	196.4
B	50.0	19.4	23.8	122.4
C	50.0	19.4	19.5	100.5
D	100.0	38.9	42.2	108.6
E	100.0	38.9	36.9	95.0
F	100.0	38.9	52.2	134.3
G	100.0	38.9	39.7	102.1

注: Theoretical H_3PO_4 amount = label claim $\times \frac{M_{H_3PO_4}}{M_{C_8H_{12}N_2 \cdot H_3PO_4 \cdot H_2O}} = \text{label claim} \times \frac{98.00}{252.20}$

H_3PO_4 content = $\frac{H_3PO_4 \text{ Amount}}{\text{Theoretical } H_3PO_4 \text{ amount}} \times 100\%$

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

UPLC 方法的优化: 在进行液相方法建立的时候, 需要同时考虑色谱柱和样品的特性, 以便获得稳定可靠的方法。色谱柱是实现液相分离的重要环节, 不同的色谱柱品名, 不同的硅醇基活性, 能大大影响色谱柱的表现, 本文通过对 Waters UPLC 的四种常用的色谱柱, 规格均为 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μ m), 具有代表性的四种固定相 C8、C18、RP18 (硅胶表面嵌入极性基团的十八烷基键合柱) 和苯己基柱进行筛选, 四种色谱柱均能很好的分离川芎嗪和邻苯二甲酸二甲酯。通过比对色谱峰的拖尾因子、对称因子、柱效, 选择了 C18 色谱柱。通过查询文献

可知磷酸川芎嗪的 $pK_{a1} = 3.50$, $pK_{a2} = 6.86^{[1]}$, 根据色谱分离的基本原理, 通过改变流动相的 pH 值, 来改变化合物的带电状态, 实现良好的色谱分离。缓冲液选择了 0.1% 的甲酸水溶液和 0.1% 乙腈溶液。川芎嗪属于强极性化合物, 而供试品可能有弱极性的有关物质邻苯二甲酸二甲酯存在, 所以选择 10~90% 的乙腈梯度洗脱, 在 1 分钟内两个组分分离出峰。

有关物质邻苯二甲酸二甲酯的检测, 邻苯二甲酸二甲酯是磷酸川芎嗪生产过程中可能带入的杂质, 但是邻苯二甲酸二甲酯在 300 nm 波长处是弱吸收, 其最大吸收波长是 274 nm, 为了同时检测有关物质邻苯二甲酸二甲酯, 本文采用了双波长检测法, 药典采用加大进样量的方法来检测相关物质, 进样过载容易导致川芎嗪出峰处形成柱残留, 缩短色谱柱的使用寿命,

采用双波长法更加的经济,环保。

IC 方法的优化:离子色谱流动相的选择原则是:可以用等度的时候不用梯度洗脱,通过对比洗脱液 KOH 的比例分别为 30、35、40 mM 时的分离度。当淋洗液浓度为 40 mM 时,磷酸根离子与未知杂质离子不能分离,当 KOH 淋洗液浓度为 35 mM 时,磷酸根离子的主峰与杂质峰的分离度为 1.88,磷酸根离子色谱峰的不对称度为 1.23,拖尾因子为 1.13,色谱柱塔板数 7176,这些色谱参数均优于 KOH 淋洗液浓度为 30 mM,所以 KOH 淋洗液浓度选择 35 mM。同时对比了流速 0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min。随着流速的增大,磷酸根的峰形会改善,出峰时间提前,但当流速增加到 1.2 mL/min 时,基质里的杂质离子会对主峰磷酸有干扰,所以流速选择 1.0 mL/min。色谱柱温度的优化,分别选用 25℃、30℃、35℃ 进行比较,发现随着温度的升高磷酸根离子的保留时间随着温度的升高而减小,理论塔板数随着温度的升高而降低,拖尾因子随着温度升高而增大,不对称度也是随着温度的升高而增大,如果选择 25℃,一般离子色谱柱温箱不具备降温的功能,25℃ 时温度不容易控制,容易引起色谱峰保留时间的漂移。当温度为 30℃ 时,磷酸根离子的分离度良好,所以选择色谱柱温度为 30℃^[21-23]。

3.2 测试意义和讨论

结果显示 7 个公司生产的注射剂川芎嗪的含量都符合质量标准规定范围 90~110%,但其中 3 个公司生产的注射剂磷酸含量超标,公司 A 磷酸含量超标最多为 196.4%,公司 F 磷酸含量 134.3%,公司 B 磷酸含量为 122.4%,其余四家磷酸含量在 90~110%之内。

正常情况下,人体血浆中无机磷酸盐的含量大约为 4 mg/dL,临床关于无机磷酸盐的测定结果表明:在体内,无机磷酸盐约 10~15%通过与蛋白质结合,其余部分通常与钠、钙、镁结合,在肾小球过滤^[24,25],在成年人体内无机磷酸盐通过小肠吸收的量等于肾排出的量以达到动态平衡。体内血清磷酸盐升高会引起软组织中磷酸钙沉积,从而导致低钙血症。高磷血症可能会引起肾功能衰竭、甲状旁腺功能减退症、假性甲状旁腺功能减退、肿瘤性钙质沉着症等疾病^[26-30]。所以说,注射用磷酸川芎嗪中磷酸的测定有着重要的临床应用意义。

从外观上观察发现,磷酸含量超标的 3 个公司所生产的注射用磷酸川芎嗪外观为粉末状,而磷酸含量未超标的注射剂为针状。结合现有的两个质量标准对于注射用磷酸川芎嗪的描述:“本品为磷酸川芎嗪的无菌冻干品或经乙醇重结晶后直接分装的无菌粉末”^[16,17]。由此推断出磷酸超标的三个公司生产的注射剂为无菌冻干品,生产过程中过量的磷酸未能除去。磷酸含量合格的四个公司生产的注射剂均为结晶性粉末。通过 X 射线粉末衍射(XRPD)对各个注射剂进行分析,验证了这种推断。另外,在 IC 检测过程中发现 C 公司生产的注射剂含有氯离子,可能是生产或者装瓶过程中引入。

本文采用减量法制备供试品溶液,另外根据注射用磷酸川芎嗪说明书,其辅料只有甘露醇,所以除了主要成分:川芎嗪、磷酸、水以外的剩余成分均为辅料甘露醇,但是计算得到各个公司生产的注射剂辅料含量相差甚大,其中 C 公司生产的注射剂规格为 50 mg,但通过减量法称得药品总重量为 446.5 mg,有效成分仅占比 11.8%,D 公司生产的注射剂规格为 100 mg,

药品总重量为 116.3 mg,有效成分占比 93.0%。现有的两个质量标准对于注射用磷酸川芎嗪中的辅料用量均无限制或测试要求。但是辅料的用量和浓度水平以及活性药物成分对于决定剂型的药代动力学和稳定性是至关重要的,特别是对于直接用于静脉注射的注射剂,辅料纯度和用量的可能会影响到药物的安全性和有效性。根据辅料选用的基本原则:在满足需要的前提下,注射剂所用辅料的种类及用量应尽可能少。

另外,常用注射剂增溶性辅料多凭经验添加,安全性研究不足,在临床应用中会发现机体或者器官毒性,其临床安全性随着使用范围的扩大和使用频率的增加日渐暴露。所以,有必要加强注射用辅料的临床前安全性研究,特别是系统的肝肾毒性研究。

本文分别采用 UPLC 和 IC 法测定了注射用磷酸川芎嗪中川芎嗪和磷酸的含量,该方法操作简单、快速、灵敏度高、重现性好。相比于常规 HPLC/UPLC 测定磷酸川芎嗪含量的方法更加合理、准确、全面。本文所用方法适用于磷酸盐药物制剂的含量检测,同时为磷酸盐药物制剂的质量评估提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] 肖衍宇, 陈志鹏, 平其能, 等. 磷酸川芎嗪理化性质及生物学性质的考察[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(21): 1810-1814
- [2] Wang Ya-juan, Zhu Hui-zhi, Tong Jia-bing, et al. Ligustrazine improves blood circulation by suppressing Platelet activation in a rat model of allergic asthma [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 45, 334-339
- [3] 许洪亮, 李军. 注射用磷酸川芎嗪对脑梗死患者梗死灶面积及神经功能的干预作用观察[J]. 中国药房, 2014, 25(23): 2173-2175
- [4] Wei Ying, Liu Jia-qi, Zhang Hong-ying, et al. Ligustrazine attenuates inflammation and the associated chemokines and receptors in ovalbumine-induced mouse asthma model [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 46: 55-61
- [5] Kuang Wen-hua, Zhang Xu, Zhu Wu-fu, et al. Ligustrazine modulates renal cysteine biosynthesis in rats exposed to cadmium [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017, 54: 125-132
- [6] Zheng Hong, Wang Si-ying, Zhou Ping-kun, et al. Effects of Ligustrazine on DNA damage and apoptosis induced by irradiation[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 36 (3): 1197-1206
- [7] Lu Chun-feng, Xu Wen-xuan, Zhang Feng, et al. Ligustrazine prevents alcohol-induced liver injury by attenuating hepatic steatosis and oxidative stress[J]. International Immunopharmacology, 2015, 29(2): 613-621
- [8] Zeng Ming-fei, Pan Lin-mei, Qi Shun-mei, et al. Systematic review of recent advances in pharmacokinetics of four classical Chinese medicines used for the treatment of cerebrovascular disease [J]. Fitoterapia, 2013, 88: 50-75
- [9] Wang Peng-long, Zhao Rui, Yan Wen-qiang, et al. Neuroprotection by new ligustrazine-cinnamon acid derivatives on CoCl₂-induced apoptosis in differentiated PC12 cells[J]. Bioorganic Chemistry, 2018, 77: 360-369
- [10] Zhang Hui, Song Yu, Li Zhi-yong, et al. Evaluation of ligustrazine on the prevention of experimentally induced abdominal adhesions in rats [J]. International Journal of Surgery, 2015, 21: 115-121

- [11] Chen Jian-li, Chen Jun-mao, Wang Xiao-tao, et al. Ligustrazine alleviates acute pancreatitis by accelerating acinar cell apoptosis at early phase via the suppression of p38 and Erk MAPK pathways[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 82: 1-7
- [12] Gao Cheng-jin, Liu Yu-hao, Ma Li-jie, et al. Effects of Ligustrazine on pulmonary damage in rats following scald injury[J]. *Burns*, 2012, 38(5): 743-750
- [13] Wang Rong, Ma Chun-hua, Zhou Fan, et al. Siwu decoction attenuates oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2016, 14 (7): 499-507
- [14] Cheng Xian-Chao, Liu Xin-yong, Xu Wen-Fang, et al. Design, synthesis, and biological activities of novel Ligustrazine derivatives [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(10): 3315-3320
- [15] Zou Jin-mi, Gao Ping, Hao Xia, et al. Recent progress in the structural modification and pharmacological activities of ligustrazine derivatives [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 147: 150-162
- [16] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版第二增补本[P]. 348
- [17] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准新药转正标准第 78 册 [P]. 148-149
- [18] Lin Zheng, Gong Zi-peng, Lu Yuan, et al. A UPLC MSMS method for simultaneous determination of danshensu, protocatechuic aldehyde, rosmarinic acid, and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic studies of Shenxiong glucose injection in rats[J]. *Journal of Chromatography. B*, 2015, 997(5): 210-217
- [19] Chen Hong-ping, Gao Guan-wei, Liu Ping-xiang, et al. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry for the determination of fipronil and its metabolites in tea and chrysanthemum [J]. *Food Chemistry*, 2018(246): 328-334
- [20] Dou Li-li, Duan Li, Guo Long, et al. An UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of quercetin 3-O-rutinoside, kaempferol 3-O-rutinoside, isorhamnetin 3-O-rutinoside, bilobalide and ligustrazine in rat plasma, and its application to pharmacokinetic study of Xingxiong injection [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2017, 15(9): 710-720
- [21] Izabela Matysiak, Maria Balcerzak, Rajmund Michalski. Ion chromatography with conductometric detection for quantitation of formic acid in Polish bee honey[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 73(7): 55-59
- [22] Qiu Hui-min, Geng Jin-ju, Han Chao, et al. Determination of Phosphite, Phosphate, Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid by Two-Dimensional Ion Chromatography System Coupled with Capillary Ion Chromatography [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(12): 1910-1914
- [23] Han C, Geng J, Xie X. Determination of phosphite in a eutrophic freshwater lake by suppressed conductivity ion chromatography [J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(19): 10667-10674
- [24] Segawa H, Yamanaka S, Ito M, et al. Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a highphosphate diet[J]. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 2005, 288(3): 587-596
- [25] Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, et al. New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 27(5): 503-515
- [26] Narchi H. Hyperostosis with hyperphosphatemia: evidence of familial occurrence and association with tumoral calcinosis [J]. *Journal of Pediatrics*, 1997, 99(5): 745-748
- [27] McClatchie S, Bremner AD. Tumoral calcinosis: an unrecognized disease[J]. *British Medical Journal*, 1969, 1(5637): 153-155
- [28] Hacıhanefioglu U. Tumoral calcinosis. A clinical and pathological study of eleven unreported cases in Turkey [J]. *Journal of bone and joint surgery*, 1978, 60(8): 1131-1135
- [29] Adams WM, Laitt RD, Davies M, et al. Familial tumoral calcinosis: association with cerebral and peripheral aneurysm formation [J]. *Journal of Neuroradiology*, 1999, 41(5): 351-355
- [30] Goldenstein PT, Neves PD, Balbo BE, et al. Dialysis as a treatment option for a patient with normal kidney function and familial tumoral calcinosis due to a compound heterozygous FGF23 mutation [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2018, 72(3): 457-461

(上接第 1405 页)

- [14] Senzer N, Barve M, Kuhn J, et al. Phase I trial of "bi-shRNAi(furin)/GMCSF DNA/autologous tumor cell" vaccine (FANG) in advanced cancer [J]. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2012, 20(3): 679-686
- [15] Trieu V, Hwang L, Ng K, et al. 515P First-in-human Phase I study of bacterial RNA interference therapeutic CEQ508 in patients with familial adenomatous polyposis (FAP)[J]. *Annals of Oncology*, 2017, 28(suppl_5): mdx393.041-mdx393.041
- [16] Kelwick R, Desantis I, Wheeler GN, et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family[J]. *Genome biology*, 2015, 16(1): 113
- [17] Lee S, Yoon DS, Paik S, et al. microRNA-495 inhibits chondrogenic differentiation in human mesenchymal stem cells by targeting Sox9 [J]. *Stem cells and development*, 2014, 23(15): 1798-1808
- [18] Masui T, Hosotani R, Tsuji S, et al. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer [J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2001, 7 (11): 3437-3443
- [19] Held-Feindt J, Paredes EB, Blomer U, et al. Matrix-degrading proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas[J]. *International journal of cancer*, 2006, 118(1): 55-61
- [20] Li M, Liu L, Zang W, et al. miR365 overexpression promotes cell proliferation and invasion by targeting ADAMTS-1 in breast cancer [J]. *International journal of oncology*, 2015, 47(1): 296-302
- [21] Liu C, Zhao L, Zhao J, et al. Decreased ADAMTS-13 level is related to inflammation factors and risk stratification of acute lymphoblastic leukemia patients[J]. *Medicine*, 2017, 96(7): e6136