

喜炎平中穿心莲内酯磺化物 E 含量测定对照品量值传递方法研究

邹晓丽¹, 于翠翠¹, 许卉^{1*}, 李志勇², 刘珂¹

(1. 烟台大学药学院, 烟台 264005; 2. 江西青峰药业有限公司, 赣州 341000)

摘要 目的: 喜炎平是穿心莲内酯通过磺化反应制得的一种中药注射液, 穿心莲内酯磺化物 E 是其中的主要成分, 也是产品质量控制的目标成分。本文研究建立穿心莲内酯磺化物 E 对照品的量值传递方法。方法: 选用化学性质稳定且具有法定标准的母体化合物穿心莲内酯作为表征性参比物质, 通过 HPLC 测定表征性参比物质与穿心莲内酯磺化物 E 的标准曲线, 以其斜率的比值表征两者的摩尔紫外吸收系数比值, 并作为校正因子, 通过表征性参比物质的量值结合校正因子来传递穿心莲内酯磺化物 E 的量值。结果: 表征性参比物质穿心莲内酯与穿心莲内酯磺化物 E 的校正因子为 2.2912 (RSD = 1.8%, n = 6)。结论: 以穿心莲内酯为表征性参比物质, 通过校正因子, 可实现穿心莲内酯磺化物 E 对照品量值的准确传递。

关键词: 喜炎平; 穿心莲内酯磺化物 E; 穿心莲内酯; 对照品; 量值传递

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0134-04

Study of a potency value transmission method for reference standard of andrographolide sulfonate E in Xiyanning injection

ZOU Xiaoli¹, YU Cui-cui¹, XU Hui^{1*}, LI Zhi-yong², LIU Ke¹

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

2. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Ganzhou 341000, China)

Abstract Objective Andrographolide sulfonate E is one of the main constituents in Xiyanning an injection made from andrographolide through sulfonating reaction. A potency value transmission method for reference standard of andrographolide sulfonate E was established. **Methods** The parent compound andrographolide was selected as a deputy reference substance. Calibration curves of andrographolide and andrographolide sulfonate E were determined by HPLC-UV and the slope ratio was defined as a calibration factor representing the mole ultraviolet absorption coefficients ratio of the two substances. Thus the potency value of sulfonate E reference standard could be transmitted by the value of deputy reference substance combining with the calibration factor. **Results** The calibration factor is 2.2912 with RSD 1.8% (n = 6). **Conclusion** The potency value of andrographolide sulfonate E reference standard can be transmitted accurately to keep constant continuously.

Key words Xiyanning injection; andrographolide sulfonate E; andrographolide; reference substance; value transmission

在药品质量控制过程中, 保证药品标准物质具有清楚的溯源与准确的量值传递有着十分重要的意义。药品标准物质的量值传递一般采用药品质量标准规定的法定方法或经过方法学论证的其他有效方法^[1]。在标准物质本身不稳定或不易获取的情况下, 传统的标定方法将无法有效实现准确的量值传递, 选择合适的参比基准物, 通过其量值结合校正因子的方法可以较好地解决这类问题^[2~4]。

喜炎平是穿心莲内酯经与硫酸进行酯化反应制备而成的中药注射剂, 具有清热解毒、止咳止痢的功效, 临床广泛用于支气管炎、扁桃体炎、细菌性痢疾等^[5]。其主要成分为穿心莲内酯的系列磺化物, 其中以磺化物 E 的含量最高^[6], 适于作为注射液质量控制的目标成分。但磺化物 E 的水溶性强, 分离精制较为困难, 且稳定性较差, 不易获得与保存, 针对这一成分进行检测的方法目前未见文献报道。为

* 通讯作者 Tel: (0535) 6706030-8009; E-mail: xuhu33@sina.com

此,我们建立了一种以穿心莲内酯为表征性参比物质,间接测定喜炎平注射液中穿心莲内酯磺化物 E 含量的方法,并进一步探讨影响该方法准确性的主要因素,进而论证了方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1100 液相色谱仪 (仪器 A), 包括 G1312A 二元泵系统、G1329A 自动进样器、G1314A 紫外检测器、G1379A 在线脱气机、HP ChemStation 色谱工作站; Agilent 1200 色谱仪 (仪器 B), 包括 G1310A 四元泵系统、G1329A 自动进样器、G1314B 紫外检测器、G1322A 在线脱气机、HP ChemStation 色谱工作站; Waters 2690 液相色谱仪 (仪器 C), 包括 Waters 2690 四元泵系统、Waters 996 二极管阵列检测器、Millennium 32 色谱工作站。穿心莲内酯对照品, 批号 0797-200307, 纯度 99.8%, 购自中国药品生物制品检定所; 穿心莲内酯磺化物 E 对照品由烟台大学药学院制备, 化学结构经 NMR 和 MS 等谱学方法综合确证, 色谱归一化纯度为 99.2%; 喜炎平注射液 (批号: 20081112 20081114) 由江西青峰药业提供。所用试剂均为色谱纯或分析纯。

1.2 溶液配制 精密称取穿心莲内酯磺化物 E 对照品适量, 甲醇溶解制成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 精密量取上述溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释定容, 并依此类推, 等比稀释得穿心莲内酯磺化物 E 浓度为 100 50 25 12.5 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准系列溶液, 用于磺化物 E 标准曲线测定。同法配制穿心莲内酯标准系列溶液, 用于表征性参比物质标准曲线测定。

1.3 色谱条件 色谱柱 1、2 分别为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 和 YMC C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 色谱柱温 30 °C, 流动相为 A (乙腈-异丙醇比例为 1:2) - B (0.2% 磷酸) 25:75 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 225 nm, 进样量 20 μL 。

2 实验结果

2.1 表征性参比物质的选择 在注射液产品质量控制时, 采用 HPLC-UV 法测定其中穿心莲内酯磺化物 E 的含量, 因此, 表征性参比物质在磺化物 E 分析的 HPLC 色谱条件下应有合适的保留时间, 并在检测波长处与磺化物 E 有相似的光谱行为, 以减少仪器的波长示值偏差所带来的测量误差。作为磺化物 E 的母体化合物, 穿心莲内酯与磺化物 E 具有相同的发色团, 在 (225 ± 5) nm 波长范围内, 二者的紫外吸收光谱曲线相似; 在相同浓度下, 二者的紫外响应相近 (图 1)。在磺化物 E 的 HPLC 色谱系统

中, 穿心莲内酯的保留时间适宜, 约 15 min 且与磺化物 E 及注射液中其他成分的分度良好, 不产生相互干扰 (图 2)。此外, 穿心莲内酯化学性质稳定, 且有明确的药典标准, 其商业对照品易得。因此, 选择穿心莲内酯作为表征性参比物质, 并选择 225 nm 作为测定波长。

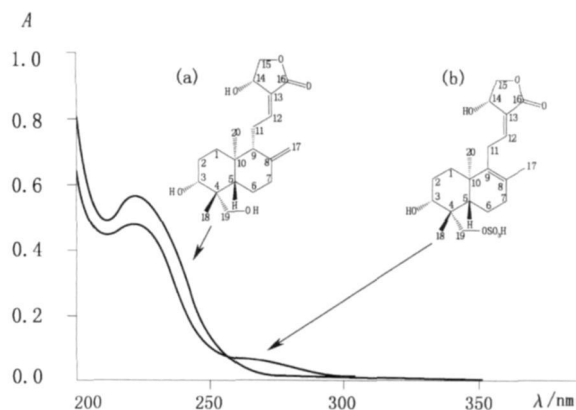


图 1 穿心莲内酯(a)和穿心莲内酯磺化物 E(b) 的 UV 光谱图
Fig 1 The UV spectra of andrographolide(a) and andrographolide sulfonate E(b)

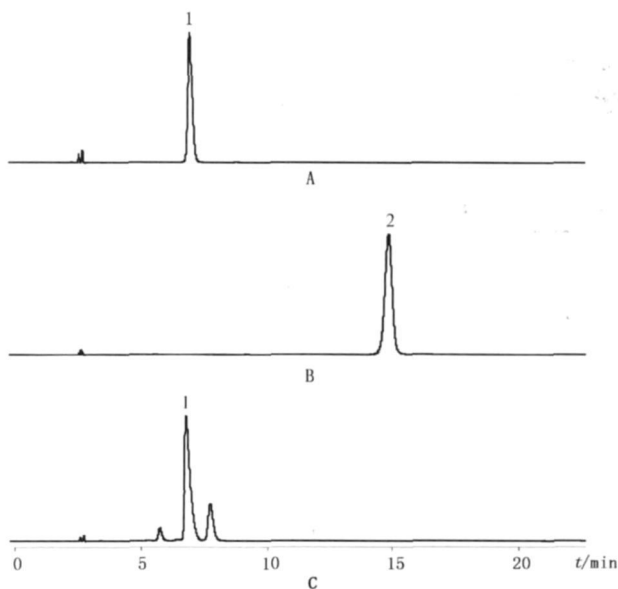


图 2 对照品穿心莲内酯磺化物 E(A)、穿心莲内酯(B)及喜炎平注射液(C)的 HPLC 谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substance andrographolide sulfonate E(A), andrographolide(B) and Xiyanyanping injection(C)

1. 穿心莲内酯磺化物 E (andrographolide sulfonate E) 2. 穿心莲内酯 (andrographolide)

2.2 校正因子的确定 用 3 台不同的液相色谱仪、2 根不同的色谱柱, 分 3 d 在相同的色谱条件下分别测定穿心莲内酯磺化物 E 和表征性参比物质穿心莲内酯的标准曲线。以相应的色谱峰面积 Y 对进样量 $X (\mu\text{g})$ 进行线性回归的统计结果见表 1。根据

校正后标准曲线的斜率计算磺化物 E 和穿心莲内酯标准曲线的斜率比, 即得校正因子, 其平均值为 2. 2912 以 RSD 计的误差为 1. 8% ($n = 6$)。由于校正因子的误差包括有日间误差、仪器误差及色谱柱

误差等综合因素^[2], 误差范围在仪器分析误差允许范围内, 因此, 可以确定磺化物 E 与穿心莲内酯的校正因子为 2. 2912。

表 1 穿心莲内酯磺化物 E 与穿心莲内酯的校正因子计算结果

Tab 1 Statistical results of calibration factor between andrographolide sulfonate E and andrographolide				
仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	穿心莲内酯磺化物 E 校正曲线 (calibrated equation of andrographolide sulfonate E)	穿心莲内酯校正曲线 (calibrated equation of andrographolide)	校正因子 (calibration factor)
A	1	$Y = 838.2X$	$Y = 1.925 \times 10^3 X$	2.309
	2	$Y = 896.4X$	$Y = 2.074 \times 10^3 X$	2.314
B	1	$Y = 905.6X$	$Y = 2.012 \times 10^3 X$	2.263
	2	$Y = 891.1X$	$Y = 2.016 \times 10^3 X$	2.221
C	1	$Y = 897.1X$	$Y = 2.073 \times 10^3 X$	2.310
	2	$Y = 932.9X$	$Y = 2.182 \times 10^3 X$	2.338

2.3 仪器波长对测定结果的影响 HPLC 的 UV 检测器波长示值可能存在偏差。国家计量局的仪器检定规程中限定, HPLC 紫外检测器的波长示值误差为 $\pm 2\text{ nm}$ 。利用液相色谱仪 A 和 B 分别在 223、225、227 nm 波长处测定穿心莲内酯磺化物 E 与穿心莲内酯的校正因子, 比较波长偏差对实验结果的影响。在 223 和 227 nm 波长处, 磺化物 E 和参比

物质穿心莲内酯标准曲线斜率的比值与 225 nm 波长处的比值的相对偏差见表 2。由于此偏差是假设仪器处于最大波长偏差 ($\pm 2\text{ nm}$), 且综合了仪器和色谱柱间的误差, 故可看作波长偏差对测定结果影响的极限值^[2], 即波长偏差所致的误差应小于 1.5%。

表 2 波长偏差对校正因子测定结果的影响

Tab 2 Effect of wavelength deviation on the calibration factor between andrographolide sulfonate E and andrographolide								
仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	波长 (wavelength) /nm	校正曲线斜率 (slope of calibrated equations)		斜率比 (ratio of slope)	相对偏差 (relative deviation) /%		
			穿心莲内酯磺化物 E (andrographolide sulfonate E)	穿心莲内酯 (andrographolide)		223 nm / 225 nm	227 nm / 225 nm	
A	1	223	893.5	2069.7	2.3164	0.85	0.43	
		225	838.2	1925.2	2.2968			
		227	901.2	2078.8	2.3067			
	2	223	892.1	2084.5	2.3366	0.98	1.18	
		225	896.4	2074.3	2.3140			
		227	886.8	2076.4	2.3414			
B	1	223	952.5	2132.4	2.2387	1.06	0.63	
		225	891.1	2016.3	2.2627			
		227	993.8	2234.6	2.2485			
	2	223	910.8	2045.1	2.2454	1.08	1.00	
		225	905.6	2011.6	2.2213			
		227	926.3	2037.9	2.1991			

2.4 量值传递的准确性验证 取 2 个批号 (20071112, 20071114) 的喜炎平注射液 2 mL, 分别过 ODS 小柱 (100 mm × 1.5 mm, 30 μm), 35% 甲醇水洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 弃去最初的 25 mL 洗脱液, 继续洗脱, 收集 15 mL 洗脱液, 并稀释至 25 mL, 在液相色谱仪 A、B 以及色谱柱 1、色谱柱 2 上分别

以表征性参比物质穿心莲内酯和穿心莲内酯磺化物 E 对照品为基准, 测定并计算样品中磺化物 E 的含量。表 3 数据显示, 利用穿心莲内酯作为表征性参比物质结合校正因子计算出的含量与直接利用磺化物 E 对照品计算出的含量偏差均小于 1.5%, 完全在分析误差所要求的范围内。

表 3 以穿心莲内酯为表征性参比物质进行量值传递的准确性验证结果

Tab 3 Accuracy validation of value transmission with andrographolide as intermediate reference substance					
批号 (Lot No)	仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	含量 (content) /mg · mL ⁻¹		相对偏差 (relative deviation) /%
			I	II	
20081112	A	1	0.812	0.806	- 0.70
		2	0.808	0.801	- 0.87
	B	1	0.789	0.799	1.26
		2	0.796	0.802	0.75
20081114	A	1	0.698	0.693	0.72
		2	0.664	0.658	0.90
	B	1	0.658	0.667	- 1.37
		2	0.654	0.662	1.22

I 直接以穿心莲内酯磺化物 E 对照品为外标计算 (calculated with andrographolide sulfonate E as standard)
II 以标准参比物质为外标计算, 再乘以校正因子 (calculated with intermediate reference substance and calibration factor)

3 讨论

穿心莲内酯是常用中药穿心莲抗炎、抗菌、抗病毒的主要活性成分, 喜炎平是其经过磺化修饰所得的水溶性混合物, 穿心莲内酯磺化物 E 为其中的主要成分。本文建立了以穿心莲内酯作为表征性参比物质, 通过表征性参比物质的量值结合校正因子的分析方法, 有效解决了目标成分对照品不易获得的问题, 可实现喜炎平注射液中穿心莲内酯磺化物 E 量值的准确传递, 结果令人满意, 适于在产品质量控制中推广应用。

参考文献

1 WANG Kai-min (汪开敏), CHAI Yu-sheng (柴玉生), CHEN Xiang-yuan (陈香元). The working principle of value traceability and value transmission of pharmaceutical reference materials (药品对照品的量值溯源与量值传递工作原则). *J Chin Pharm Aff* (中国药事), 1998, 12(2): 113
2 LU Min (刘敏), HU Chang-qin (胡昌勤), YAO Shang-chen (姚尚辰). Study of a potency value transmission method for nor-

vancomycin reference standard (去甲万古霉素对照品量值传递方法的研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(3): 355
3 HUANG Xin (黄信), ZHENG Yang (郑阳), ZENG Ze-yu (曾泽玉), et al Quantitative determination of lignans in Fructus Actiis extracted by corrected factor (HPLC 校正因子法测定牛蒡子提取物中总木脂素含量). *J Chengdu Univ Tradit Chin Med* (成都中医药大学学报), 2005, 28(4): 42
4 LI Yu-lan (李玉兰), LU Min (刘敏), WANG Yu (王玉). HPLC determination of related substances in sulbactam sodium (舒巴坦钠中舒巴坦青霉素杂质含量测定方法的建立). *China Pharm* (中国药师), 2005, 8(6): 467
5 TANG Chun-shan (唐春山). Sulfonation techniques for water-soluble andrographolide (水溶性穿心莲内酯磺化工艺). CN: 1349986A, 2002-05-22
6 TANG Chun-shan (唐春山), YE Wen-cai (叶文才), HU Yong-mei (胡永美), et al Andrographolide sulfonates and their mixture for drug use (穿心莲内酯磺化衍生物及其药物组合物). CN: 1687049A, 2005-10-26

(本文于 2009 年 2 月 4 日收到)