

4.3 检测波长的比较

在选取检测波长时,被借鉴的 USP 个论方法采用 214 nm 为检测波长,但其目的是用于克林霉素磷酸酯的含量测定,而非有关物质检测。本实验重点在于改进本剂型质控标准的有关物质检测方法,因此有必要针对杂质检测选择更为灵敏、合适的检测波长。在配备了 DAD 检测器的色谱仪上对本品进行测试,同时监测 214 nm 与 210 nm 两个波长,实验数据表明 210 nm 更适合于检测本品主药的相关物质。

4.4 特定杂质 7-差向克林霉素磷酸酯

为分离出克林霉素磷酸酯主峰前的“未知杂质”(已用海翔药业提供“7-差向克林霉素磷酸酯”杂质对照品确认,该杂质的安全性评价有待开展)。本次方法改进探索研究初期,在 USP 梯度洗脱方法基础上进行了很多尝试,但对其所作的任何改动、优化,相应的方法学验证均表明其未能超越 USP 个论方法已有的分离水平,直至将色谱柱换用 C₁₈ 柱结合采用 USP 梯度洗脱程序后,克林霉素磷酸酯主峰前的“未知杂质”方得以成功分离。本法应是目前最好的改进方法。因此作为一个阶段性成果,在未开发出更出色的分离方法之前,建议采用本法控制克林霉素磷酸酯原料及注射剂的有关物质,使其在实践中得以发展、完善。

4.5 特定杂质克林霉素 B 磷酸酯

克林霉素磷酸酯合成过程中可能产生多种反

应残留物和副产物,如林可霉素、克林霉素、克林霉素 B、克林霉素 B 磷酸酯(保留时间 15.3 min)及 7-表克林霉素磷酸酯(保留时间 19.9 min)等,见图 1。林可霉素和克林霉素已加以控制,但有文献报道克林霉素 B 与克林霉素 B 磷酸酯可能导致严重不良反应;因此有必要对克林霉素 B 磷酸酯加以重点控制。研究表明,系统适用性试验表明克林霉素 B 磷酸酯不受相邻各组分及溶剂干扰。强力破坏试验产生的降解产物对克林霉素 B 磷酸酯也无干扰。

REFERENCES

- [1] USP 34 Vol II [S]. 2011: 2376, 2377, 2378.
- [2] EP 7.0 Vol II [S]. 2011: 1717.
- [3] JP 15 [S]. 2006: 470.
- [4] CHEN Q, LI X W, LI L G. The study of clindamycin phosphate injection stability [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2009, 15(7): 31-33
- [5] CHANG L J, ZHAO X F. To compare the stability of clindamycin phosphates for injection and clindamycin [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医学), 2009, 22(3): 300-301.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. China National Drug Standards(国家药典委员会.国家药品标准) [S]. WS₁-(X-020)-2003Z, X32-164.
- [7] Chinese chemical drug standards. Standards for registration(化学药品标准.注册标准) [S]. YBH09502003.
- [8] ZHANG D S, LI J, XU M Z, et al. Comparison of the ultrafast liquid chromatography with normal high-performance liquid chromatography for determination of clindamycin phosphate and its related substances [J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2008, 33(6): 347-349.

收稿日期: 2011-12-19

寡核苷酸抗流感药物流感泰得钠含量测定

仲婕^{1,2}, 李保山^{1,2}, 朱德领^{1,2*}, 张金钟^{1,2}, 施明珠^{1,2}, 殷爱军^{1,2}(1.杭州天龙药业有限公司, 杭州 310021; 2.军科天龙药物研究院, 杭州 310021)

摘要: 目的 用离子色谱法(IC)、原子吸收光谱法(AAS)评价抗流感药物钠含量,探讨两种测量方法定量结果的一致性。方法 在戴安 ICS900 离子色谱仪上,用阳离子分析柱 Ionpac CS12(4 mm×250 mm),流动相: 甲烷磺酸;抑制型电导检测;流速 1 mL·min⁻¹;测量结果与国标方法(火焰原子吸收光谱法)进行方法学评价比较;应用配对 *t* 检验和 Bland-Altman 法对两种测量方法进行一致性评价。结果 两种方法的精密度分别为 2.0%和 0.7%,重现性分别为 2.0%和 7.96%,回收率分别为 99.6%和 89.8%,测量结果无显著性差异,配对 *t* 检验 *P*>0.05; Bland-Altman 法一致性评价的 95%一致性界限为: (-1.514, 1.487),绝大多数差值都位于该区间内。结论 IC 的重复性和回收率均优于 AAS; Bland-Altman 法综合判断两组数据具有高度的一致性。

基金项目:“十二五”国家重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-009-09)

作者简介: 仲婕,女,副研究员 Tel: (010)66931423 E-mail: law1022@163.com *通信作者: 朱德领,男,硕士,教授级高级工程师 Tel: (0571)81635678 E-mail: delinzh@163.com

关键词: 离子色谱法; 原子吸收光谱法; 钠含量; *t* 检验; Bland-Altman 法; 一致性

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)08-0730-05

Study on the Content of Sodium in Oligonucleotide Bulk Pharmaceuticals-Flutide

ZHONG Jie^{1,2}, LI Baoshan^{1,2}, ZHU Deling^{1,2*}, ZHANG Jinzhong^{1,2}, SHI Mingzhu^{1,2}, YIN Aijun^{1,2} (1. Hangzhou Tianlong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310021, China; 2. Institute of Junke Tianlong Materia Medica, Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine sodium content in oligonucleotide bulk pharmaceuticals by ion-chromatography and atomic absorption spectrophotometry. To evaluate the degree of agreement between measurements. **METHODS** Ion chromatography (IC) was carried out by using an Ion-pac CS12 column (4 mm×250 mm) with methanesulfonic acid as the mobile phase, suppressed conductivity detector, on Dionex ICS 900. The results was compared with atomic absorption spectrophotometry (AAS) method provided by national standard. By using paired *t* test and Bland-Altman method to estimate consistency of two methods. **RESULTS** The two method results showed that the precision were 2.0% and 0.7%, the repeatability were 2.0% and 7.96%, the analytical recovery were 99.6% and 89.8% for ion-chromatography and atomic absorption spectrophotometry, respectively. The mean difference was -0.0136% with 95% confidence. **CONCLUSION** There is no significant difference compared with the national standard method-AAS. Moreover, the ion-chromatography method had demonstrated its superiority in repeatability and analytical recovery.

KEY WORDS: IC; AAS; sodium content; paired *t* test; bland-altman method; the degree of agreement

测定钠的方法较多, 有化学比浊法、火焰光度法(EP)、离子选择电极法(ISE)、原子吸收光谱法(AAS)、离子色谱法(IC)等。化学比浊法已淘汰; EP 分析条件难以控制, 且灵敏度及精密度都比 AAS 和原子发射法差; ISE 电极老化快, 寿命短, 造成消耗品成本大, 且电极的材料不同, 电极的选择系数也不同, 这对待测离子的影响是一个难以预测的变量; AAS 是国家标准^[1]和医院制剂^[2-3]检验中常用的方法; IC 将经典的离子交换色谱与高效液相色谱技术相结合, 具有迅速、连续、高效、灵敏等优点。抗流感新药 FLUTIDE, 是寡核苷酸的钠盐, 分子式为 C₁₂₆H₁₅₂O₇₀N₃₆S₁₂P₁₂Na₁₂, 化学名: 2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷基-(3'→5'O,O-硫代磷酸基)-胸腺嘧啶核苷-十二钠。因为其分子量较大, 结构较复杂, 受大分子环境的影响, 钠电离更为复杂, 因此分析方法上有些

局限。而钠含量又是本品原料药一个次重要的质量控制指标, 有必要准确定量, 精确控制质量。

本实验采用 AAS 和 IC 同时测定寡核苷酸抗流感药物中钠含量, 前者是将样品的水溶液吸进空气-乙炔火焰中, 钠被解离成基态原子, 能吸收 588.9 或 330.2 特征谱线的光(特征谱线由钠空心阴极灯提供), 与标准钠溶液比较光谱吸收量, 记录峰高。后者是应用离子交换的原理, 使被测钠离子在阳离子交换柱上与 H⁺ 交换, 再用强阳离子洗脱剂洗脱下来, 以达到与基质中相邻峰分离的目的, 将产生的电导信号, 转变成色谱值, 与标准钠离子比较色谱值确定含量。从光谱数据和色谱数据综合分析这一大分子中的钠含量, 比较两种方法的优劣, 评价两种方法所得结果的一致性程度^[4-5]。

1 仪器与试剂

ICS-900 离子色谱仪(美国 Dionex 公司), 抑制型电导检测器, Chromeleon 色谱工作站。色谱柱为 Ionpac CS12 离子交换柱(4 mm×250 mm)。

AA-6300C 原子吸收分光光度计(日本岛津); 钠空心阴极灯(日本 HAMAMATSU PHOTONICS K.K. 公司); 乙炔气(杭州气体厂, 纯度≥98%); QSAC-106 空气压缩机(北京瑞昌汇博科技有限公司)。

钠离子标准溶液[1 000 mg·L⁻¹, 国家标准物质研究中心, 批号: GBW(E)080526]; 甲烷磺酸(Fluka 公司, 优级纯, 批号: 0001427804)。超纯水(18.2

MΩ·cm⁻¹, Millipore 公司)。

试验用药物(寡核苷酸抗流感新药, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所九室)。

2 测试条件

2.1 IC 色谱条件

色谱条件: 淋洗液为 20 mmol·L⁻¹ 甲烷磺酸, 电导检测; 流速 1 mL·min⁻¹; 抑制器的抑制电流为 59 mA; 进样量 10 μL。

2.2 AAS 检测条件

吸收波长 588.9 nm, 狭缝 0.2 nm, 灯电流 8 mA, 乙炔-空气火焰, 燃气(乙炔)1.8 L·min⁻¹, 助燃气(空气)15.0 L·min⁻¹, 进样体积 20 μL。

3 方法和结果

3.1 对照品溶液的制备和线性

取市售钠标准溶液(1 000 mg·L⁻¹), 用超纯水稀释至表 1 所列浓度, 作为对照品溶液, 分别用 AAS 和 IC 测定吸收度和峰面积。结果见表 1。

3.2 样品前处理

取样品 0.4~0.5 g 置钳锅中, 电炉上缓缓灼灼至完全炭化, 放冷, 加浓硫酸 1 mL 使润湿, 低温加热至硫酸蒸气除尽后, 在 500~600 °C(实验中控制马福炉温度在 550 °C)使完全灰化, 移至干燥器中, 备用, 临用时以水定量稀释至所需浓度, 作为供试品溶液。

3.3 仪器精密度试验

取钠标准溶液, IC(0.029 mg·mL⁻¹), AAS (0.83×10⁻³ mg·mL⁻¹), 分别用 IC 和 AAS 重复测定 6 次, RSD 分别为 2.00%和 0.70%。结果见表 1。

3.4 重复性试验

取同一批样品, 共 6 份, 按“3.2”项下方法处理制得样品贮备液, 按 IC 和 AAS 所要求的浓度范围稀释, 进样, 测定样品含量, 计算 RSD 分别为 2.00%和 7.96%。结果见表 1。

3.5 回收率测定

3.5.1 IC 回收率试验 取样品 0.23 g, 共 6 份, 分别置 25 mL 量瓶中, 加水溶解, 分别取 4 mL 置钳锅中, 分别加入钠标准溶液(1 mg·mL⁻¹)2.0, 2.0, 2.5, 2.5, 3.0 和 3.0 mL。置电炉上缓慢蒸干, 置于 500~600 °C 的马富炉中, 灼灼至灰化, 残渣用水溶解, 定量转移至 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 作为母液。取 1 mL 母液置 10 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 过滤, 作为 IC 回收率测定用溶液, 分别进样 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件测定。结

果见表 1。

3.5.2 AAS 回收率试验 取“3.5.1”项下的母液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 再取 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 作为 AAS 的加样回收率测定用溶液。分别吸入样品, 测定吸收值, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 两种方法对比试验结果

Tab 1 Comparative study of IC and AAS to determination the sodium content

	AAS		IC	
	浓度×10 ⁻³ / mg·mL ⁻¹	吸收值	浓度/mg·mL ⁻¹	峰面积
1	0.125	0.048 9	0.05	4.865 2
2	0.25	0.079 5	0.1	10.474 05
3	0.5	0.140 0	0.15	15.588 8
4	1	0.283 5	0.2	20.676 05
5	2	0.592 7	0.25	26.660 7
6			0.3	31.720 15
线性方程	Y=0.289 4X+0.006, r=0.999 1		Y=107.38 X -0.461 4, r=0.999 7	
线性范围	(0.125~2.000 0)× 10 ⁻³ /mg·mL ⁻¹		0.05~0.3 mg·mL ⁻¹	
仪器 精密度	RSD 0.70%, n=6		RSD 2.00%, n=6	
重复性	RSD 7.96%, n=6		RSD 2.00%, n=6	
回收率	89.8%, RSD 6.70%, n=6		99.6%, RSD 2.66%, n=6	

3.6 样品的含量测定

取样品 0.46 g, 置于 500~600 °C 的马富炉中, 灼灼至灰化, 残渣用水溶解, 定量转移至量瓶中, 加水稀释至所需浓度, 样品测定结果见表 2。

3.6.1 t 检验 假设 H₀: 两种仪器方法检验结果含量无偏差, 即 μ_d=0; H₁: 有偏差, 即 μ_d≠0, α=0.05。

因为 n=12, ∑d=-0.164, ∑d²=6.448, 所以偏差的平均值为 -0.164/12=-0.0136(%), Sd=1.94, t=0.024, v=n-1=12-1=11。

查 t 界值表, t_{0.0511}=2.201, 现 t=0.024<2.201, 得 P>0.05, 按 α=0.05 水准接受 H₀ 假设。

3.6.2 Bland-Altman 检验 用差值进行 Bland-Altman 的分析^[4-5], 见图 1。从图中可以看出, 差值的均数为 -0.013 666 667, 差值的标准差 Sd=0.765, 则 95%一致性界限为 (-1.514, 1.487)。全部点在 95%一致性界限以内, 差值的绝对值最大为 1.286%, 两种方法平均为 6.33%, 这种相差的幅度在实际产品检验中可勉强接受。因此可以认为两种方法测量的结果仍具有一致性, 可以相互替代。

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 The content of sodium in oligonucleotide bulk pharmaceuticals

样品号	含量/%		均值/%	差数 d	比值	d ²
	IC	AAS				
1	5.82	5.85	5.835	0.030	1.005	0.000 9
2	5.90	6.18	6.040	0.280	1.047	0.078 4
3	5.93	7.17	6.550	1.240	1.209	1.537 6
4	6.159	6.66	6.4095	0.501	1.081	0.251 001
5	6.36	7.05	6.706	0.688	1.108	0.473 344
6	6.25	6.18	6.214	-0.068	0.989	0.004 624
7 ¹⁾	6.38	6.90	6.6395	0.521	1.081	0.271 441
8	6.49	5.20	5.843	-1.286	0.801	1.653 796
9	6.62	6.32	6.470	-0.300	0.955	0.09
10	7.50	5.35	5.375	-0.050	0.991	0.002 5
11	6.53	5.12	5.825	-1.410	0.784	1.988 1
12	7.20	6.89	7.045	-0.310	0.957	0.096 1
合计			$\Sigma d = -0.164$		$\Sigma d^2 = 6.448$	
平均值			-0.013 666 7		1.008	
Sd			0.765 48		0.120 99	
95%的一致性界限			(-1.514, 1.487)		(0.764, 1.238)	

注: ¹⁾ AAS 通常分标准曲线法和标准加入法, 这一批样品除了用标准曲线法外, 还同时也用 AAS 标准加入法平行测定加以验证, 钠含量为 7.01%

Note: ¹⁾ For AAS measurements, the most common calibration technique options were calibration curve and standard addition. As validation, two calibration techniques were used for this batch of sample. The result of sodium content was 7.01% by standard addition

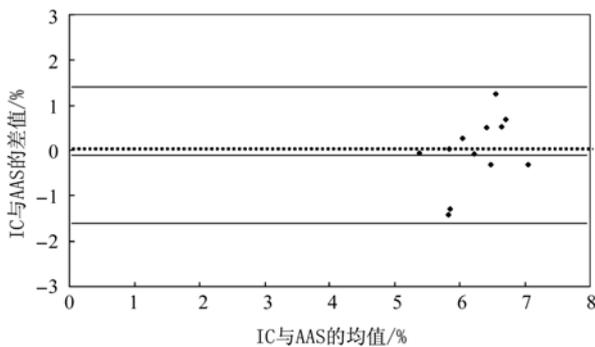


图 1 用差值进行 Bland-Altman 分析图

Fig 1 Assessing agreement between two measurements with differences by Bland-Altman method

用比值进行 Bland-Altman 的分析^[6], 见图 2。从图中可以看出, 比值的均数为 1.000 847, 接近于 1.000, 比值的标准差 $Sr=0.12$, 则 95%一致性界限为(0.764, 1.238), 所有点在此 95%一致性界限以内, 且最大值为 1.209, 最小值为 0.784。

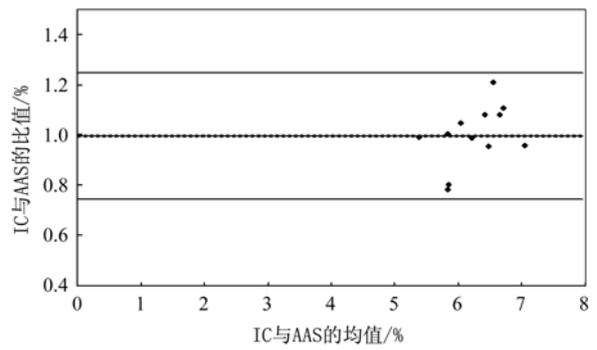


图 2 用比值进行 Bland-Altman 分析图

Fig 2 Assessing agreement between two measurements with ratios by Bland-Altman method

4 讨论

IC 测样品中的钠离子, 目标峰与其他峰可实现较好的分离, 分离度为 1.92, 理论板数以钠离子峰计算为 2 869。见图 3。

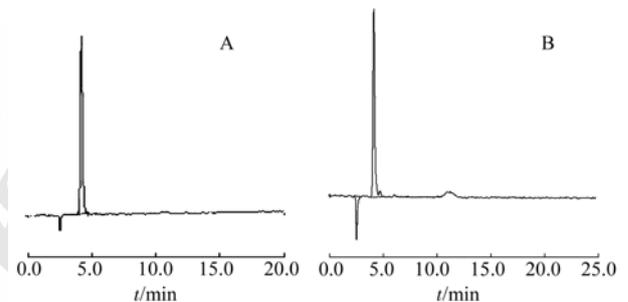


图 3 离子色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液

Fig 3 IC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution

样品在 450~550 °C 加热灰化 4~5 h, 以破坏样品的有机物基体, 排除大分子有机物干扰, 同时克服本品大分子水溶液黏度对喷雾速率的影响。

为了排除基质干扰, 在 AAS 中还用标准加入法测定, 通过用两种方法对同一批样品(第 7 批样品)钠含量进行平行测定, 标准曲线法为 6.90%, 标准加入法为 7.01%, 结果具有可比性, 基本一致, 说明标准曲线法和标准加入法均可精确测得本品的钠含量。

配对 t 检验说明, 假设 H_0 成立, 两种仪器方法检验结果含量无偏差, 即 $\mu_d=0$ 。Bland-Altman 分析法综合考虑了两种仪器的系统误差和偶然误差, 综合判断的结果显示: 两组数据具有高度的一致性, 以一致性界限和实际生产意义, 得出这两种测钠的方法具有可替代性的结论。

IC 的重复性和回收率均优于 AAS, 在条件允

许的情况下, 首选 IC 测定钠含量, 在本实验条件下, 12 批样品钠的含量为 5.82%~7.50%。

REFERENCES

- [1] GB/T 13888-2003(国家标准) [S]. 2003.
- [2] FENG Z X, CHEN Z J. Detecting the content of zinc oxide in calamine lotion by atomic absorption spectrometry [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(9): 844-846.
- [3] CHEN C, YU Y. Palladium residues determination in valaciclovir hydrochloride by graphite furnace atomic

absorption spectrometry [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(3): 260-262.

- [4] ALTMAN D G, BLAND J M. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies [J]. The Statistician, 1983, 32(3): 307-317.
- [5] BLAND J M, ALTMAN D G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement [J]. Lancet, 1986, 1(8476): 307-310.
- [6] CHEN H. Applications of Bland-Altman method for assessing agreement in clinical measuring practice [J]. Chin J Health Statistic(中国卫生统计), 2007, 24(3): 308-315.

收稿日期: 2011-11-21

HPLC 测定翅茎白粉藤中白黎芦醇的含量

刘元, 宋志钊, 文志云(广西中医药研究院, 南宁 530022)

摘要: 目的 建立翅茎白粉藤中白黎芦醇的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱 XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(25 : 75)为流动相, 检测波长为 306 nm, 柱温为室温。结果 白黎芦醇在 2.50~40.0 μg 内峰面积与其浓度呈良好线性关系($r=0.9999$), 平均回收率为 97.3%, RSD 为 0.98%($n=6$)。结论 本方法简便、准确、重复性好, 可作为该药材含量测定方法。

关键词: 翅茎白粉藤; 高效液相色谱法; 白黎芦醇

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)08-0734-03

Determination of Resveratrol in *Cissus Hexangularis* by HPLC

LIU Yuan, SONG Zhizhao, WEN Zhiyun(*Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method for detecting resveratrol in *Cissus hexangularis*. **METHODS** An XB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-water(25 : 75). The detection wavelength was 306 nm and the column temperature was room temperature. **RESULTS** Resveratrol showed a good linear relationship in the range of 2.50~40.0 μg·mL⁻¹, $r=0.9999$. The recovery and RSD were 97.5% and 0.98%($n=6$), respectively. **CONCLUSION** This method is simple, accurate and repeatable to determine the content of resveratrol in *Cissus hexangularis*. **KEY WORDS:** *Cissus hexangularis*; HPLC; resveratrol

翅茎白粉藤别名六方藤、抽筋藤, 为葡萄科白粉藤属植物翅茎白粉藤 *Cissus hexangularis* Thorel ex Planch 的干燥藤茎, 是瑶药“虎牛钻风”中的六方钻^[1], 具有祛风除湿、活血通络之功效, 用于风湿痹痛、腰肌劳损、跌打损伤。目前翅茎白粉藤尚未有法定标准, 化学成分研究也未见报道, 对其有效成分及药理学研究更是尚未涉及, 本研究参考相关文献[2-3], 采用高效液相色谱法测定

翅茎白粉藤中白黎芦醇的含量, 为翅茎白粉藤的质量控制提供了检测依据。

1 仪器与试剂

LC-20ATVP 液相色谱仪(日本岛津), 检测器 SPD-20AVP, 威玛龙色谱工作站。白黎芦醇对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111535-200502, 供含量测定用); 翅茎白粉藤药材: 20101018(金秀), 20101119(防城), 20101128(金秀), 20101208(武

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0992003A-22); 广西壮药质量标准(第二卷)标准研究项目(MZY2010054); 广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(Z2011276)

作者简介: 刘元, 女, 高级实验师 Tel: (0771)5869102 E-mail: liuyuan0821@vip.163.com