

表 1 冻干粉针剂包装密闭系统密封性不合格样品数表

Tab 1 Unqualified number of freeze-dry powder injector container closure system leak

批号	20110713P/瓶	20110719P/瓶	20110721P/瓶	20110628P/瓶	20110630P/瓶	20110705P/瓶
测真空度法	2	4	3	2	1	1
真空减压法	0	0	0	0	0	0
着色渗透法	0	0	0	0	0	0

3 讨论

本实验选用的 2 种规格、6 个批次注射用培美曲塞二钠均为距离生产日期一年后的样品，通常同批次样品在刚刚生产出来时真空度应一致，而真空度测定结果表明两种规格的注射用培美曲塞二钠密闭包装系统均存在一定程度密封性不好的现象。

真空减压法和着色渗透法测定结果均显示注射用培美曲塞二钠密闭包装系统良好。由于本实验中选用的冻干粉针剂密闭包装系统内真空度将近一个大气压，真空度很大，所以真空减压法测定冻干粉针剂密闭包装系统是无效的，或意义不大。着色渗透法由于用肉眼观察有无气泡，以及胶塞冠部是否有染色液渗透，如果密闭包装系统密封性或泄漏是非常慢的一个过程，用着色渗透法是很难发现的。测真空度法在此时显示了非常大的优势，不但可以用数据定量，还很灵敏、迅速。

注射用培美曲塞二钠密闭包装系统存在一定比例密封性不好的现象原因可能为胶塞、注射剂瓶和铝塑组合盖之间匹配不好。

注射用培美曲塞二钠由于密闭包装系统密封性不好对密闭包装系统无菌或对药品质量等的影响还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] GB/T15171-1994, Test method for leaks in sealed flexible packages (GB/T15171-1994, 《软包装件的密封性能试验方法》) [S]. 1994: 1-5.
- [2] ASTM D3078-1994, Test method for leaks in sealed flexible packages (ASTM D3078-1994, 《热封韧性包装箱的泄露的试验方法》) [S]. 1994.
- [3] YBB00112002, PP bottles for oral solid preparation (YBB00112002, 口服固体药用聚丙烯瓶) [S]. 2002: 58-61.
- [4] GAN S Y, ZHU W, CHEN C Q, et al. Non destructive detection of low vacume inside canned food and its sensors [J]. *Vacume Sic and Tech* (真空科学与技术), 2002, 2(5): 326-328.

收稿日期: 2012-10-22

HPLC 测定注射用甘草酸二铵 18 位异构体及其比值考察

谢升谷, 陈爽, 郑国钢(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定注射用甘草酸二铵 18 位异构体的方法并考察评价 55 批样品的异构体比值情况。
方法 采用 C₁₈ 色谱柱进行分离测定, 以磷酸盐缓冲盐(pH 7.0)-乙腈(80:20)为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 测定波长 252 nm。
结果 18- α 与 18- β 甘草酸二铵(18- α GL 和 18- β GL)分离度良好, 不同厂家产品的异构体比值差异较大。
结论 本方法可方便、准确、可靠的测定注射用甘草酸二铵或其他甘草酸类制剂中异构体比值, 其比值可能与甘草酸单铵转换为二铵盐时的工艺条件有关。

关键词: 注射用甘草酸二铵; 异构体; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)07-0772-04

HPLC Determination of 18-isomer of Diammonium Glycyrrhetate for Injection and Its Ratio Evaluation

XIE Shenggu, CHEN Shuang, ZHEN Guogang(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

作者简介: 谢升谷, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86459417 E-mail: xiesgu@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE A HPLC method was established for the determination of 18-epimer of diammonium glycyrrhetate for injection, and its ratio in 55 batches products was evaluated. **METHODS** A C₁₈ column was used as the stationary phase with acetonitrile-phosphate buffering solution (pH 7.0) (20 : 80) as the mobile phase, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was at 252 nm. **RESULTS** The separation of 18- α and 18- β GL was good, and the ratios of α/β were different between products. **CONCLUSION** The method can accurately determine ratios of α/β GL in diammonium glycyrrhetate for injection, its ratio may be related with its manufacturing process.

KEY WORDS: diammonium glycyrrhetate for injection; epimer; HPLC

注射用甘草酸二铵是甘草酸二铵的冻干制剂, 1994年正大天晴药业首先将甘草酸单铵继续氯化成二铵盐得到, 中间有 α/β 异构体转型工艺。本品具有一定的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用。药理实验证明^[1], 小鼠口服能减轻因四氯化碳、硫代乙酰胺和D-氨基半乳酸引起的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)升高。还能明显减轻D-氨基半乳酸对肝脏的损伤和改善免疫因子对肝脏的慢性损伤。

国内现有药典及各药品质量标准中均未对异构体进行控制。该品种国内现有生产企业36家。主要辅料有甘露醇, 代表性生产工艺: 配液→调pH值→除菌过滤→分装→冻干→轧盖。据文献报导^[2], 18 α 型和18 β 型药理及不良反应差别均较大。因此, 了解该品种异构体组成显得尤为必要。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪、Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(带DAD检测器)。注射用甘草酸二铵均来自于本所抽样, 共55批, 涉及16家生产企业, 抽样地点涉及17个省(区、市)。甘草酸单铵来源于国内主要原料供应商, 共2家生产企业, 共9批。18 α -甘草酸二铵、18 β -甘草酸二铵对照品均由企业提供, 纯度均>95%。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Boston ODS(250mm×4.6mm, 5 μ m)为分析柱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 以磷酸盐缓冲液

(取磷酸二氢钾 6.8 g, 氢氧化钠 1.164 g, 加水使成 1 000 mL, pH 应为 7.0)-乙腈(80 : 20)为流动相, 检测波长为 252 nm, 柱温为 40 $^{\circ}$ C。进样量为 20 μ L。在此条件下 2 个异构体峰均有达到基线分离, 色谱图见图 1。

2.2 检测波长选择

取供试品溶液色谱图中 18 β -甘草酸和 18 α -甘草酸峰作 DAD 扫描, 18 β -甘草酸色谱峰在 255 nm 有最大吸收, 18 α -甘草酸色谱峰在 249 nm 有最大吸收, 选择中间值 252 nm 作为检测波长。

2.3 流动相选择

据文献报道, 常用的异构体拆分系统为甲醇水系统和乙腈水系统二种。甲醇和 1%醋酸溶液的保留时间在 50 min 左右^[3], 甲醇和 0.1 mol·L⁻¹的高氯酸铵溶液(用氨水调 pH 至 8.0)分离度略差^[4]。0.1 mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液(pH 至 7.0)分离度较好且保留时间适宜, 但耐用性较差, 不同色谱柱分离效果差异较大^[5]。本实验对此流动相系统进行优化。选择以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 6.8 g, 氢氧化钠 1.164 g, 加水使成 1 000 mL, pH 应为 7.0 \pm 0.05)-乙腈(80 : 20)为流动相, 使分离度和保留时间均较好, 且耐用性良好。

2.4 溶剂选择与异构体稳定性

考虑到不同 pH、不同溶剂可能对异构体比例存在影响。考察了水、1 mol·L⁻¹盐酸溶液、0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液、0.05 mol/L 盐酸溶液、流动相、10%葡萄糖注射液(临床应用时, 以此溶解后进行注射)作为供试液溶剂时, α/β 异构体比例的变化情况, 结果见表 1。

表 1 不同溶剂中异构体比值测定结果

Tab 1 Results of isomer ratio in different solvents

溶剂	水	1 mol·L ⁻¹ 盐酸溶液	0.1 mol·L ⁻¹ 盐酸溶液	0.05 mol·L ⁻¹ 盐酸溶液	流动相	10%葡萄糖注射液
α/β 异构体比例	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3

由结果可知, 不同溶剂对异构体比例无影响, 选择水作为溶剂。

2.5 溶液配制

注射用甘草酸二铵溶液配制: 取 5 瓶, 加水

溶解混匀后,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 mg 的溶液,作为供试品溶液。

2.6 专属性试验

取水作为空白溶剂,同供试品溶液测定,记录色谱图。结果表明,空白溶剂对异构体测定无干扰,见图 1。

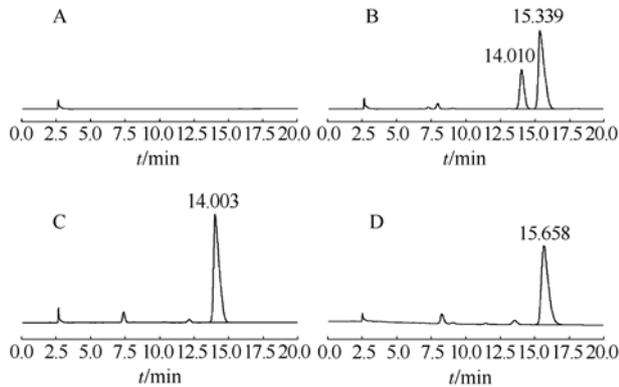


图 1 高效液相色谱图

A-空白溶剂; B-供试品溶液; C-18 β -GL 对照品溶液; D-18 α -GL 对照品溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank; B-sample solution; C-18 β -GL standard solution; D-18 α -GL standard solution

2.7 重复性试验

取同一批样品 6 份(批号: 201011054),分别精密称定,按正文方法测定结果,结果显示, α/β 异构体的平均比例为 3.3, RSD<0.1%(n=6)。

2.8 响应因子

因 18 α -甘草酸二铵和 18 β -甘草酸二铵对照品未有商业化的购买渠道,较难获得,EP 7.0^[6]甘草酸铵原料药异构体测定法项下亦选用相对保留时间进行定位,以自身对照法进行计算。

取 18 α -和 18 β -甘草酸二铵适量,精密称定,用水定量稀释制成约 0.3 mg·mL⁻¹浓度的溶液,18 α -甘草酸二铵(0.413 mg·mL⁻¹)和 18 β -甘草酸二铵(0.327 mg·mL⁻¹)分别精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录峰面积,18 α -甘草酸峰面积(5 417.3, n=5, RSD=0.1%)和 18 β -甘草酸峰面积(4 283.9, n=5, RSD=0.3%)。同时对二个色谱峰进行峰纯度考察,18 α -和 18 β -甘草酸峰分别为:1.000 和 1.000。计算二者响应因子相关系数为 1.0,在 252 nm 波长下,二者峰面积比例即能够代表其含量的比例。

2.9 耐用性试验

分别考察不同仪器、色谱柱对本方法的耐用性。条件 1: 仪器: Agilent 1100 HPLC 仪; 色谱柱: Boston ODS(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。条件 2: 仪器: 岛津 LC-20AT HPLC 仪; 色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)。其他色谱条件及供试品溶液(批号: 201011054)不变,记录色谱图。结果见图 2。

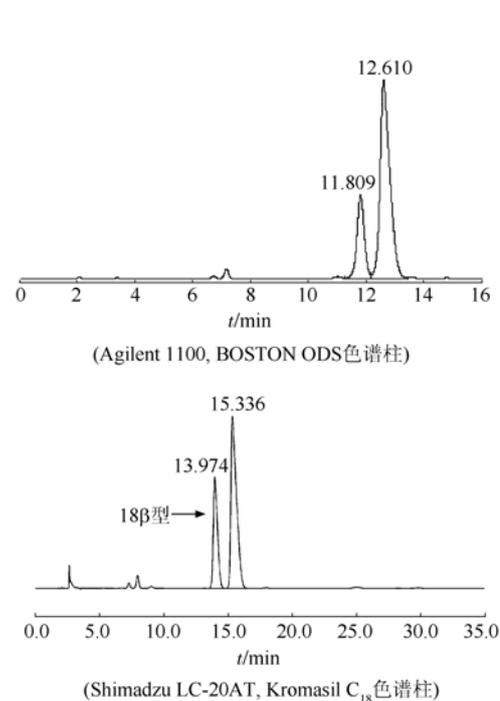


图 2 注射用甘草酸二铵典型样品图谱

Fig 2 Chromatogram of diammonium glycyrrhetate for injection

2.10 样品测定

取样品,按上述方法测定异构体比值,其中注射用甘草酸二铵结果见表 2。甘草酸二铵的合成原料甘草酸单铵均未检出 18 α -甘草酸峰。

3 讨论

甘草酸铵盐在流动相中以甘草酸的形式存在,其 18- α 甘草酸和 18- β 甘草酸的测定也有文献报道^[3-5]。本实验通过对流动相的优化,得到一个耐用性良好、分离度佳的色谱条件。同时,按上述方法对 16 家生产企业 55 批样品进行测定,18- α 甘草酸二铵和 18- β 甘草酸二铵比例(以下简称 α/β 异构体比例)均在 2.0~3.7 之间,不同企业之间差异明显。同时对所有注射用甘草酸二铵样品进行频次分析,结果表明, α/β 异构体比例 2.2、2.6、3.1 所出现的频次较高。结果见图 3。

表2 不同生产企业注射用甘草酸二铵异构体比值测定结果

Tab 2 Isomer in diammonium glycyrrhetate for injection from different pharmaceutical factories

序号	生产厂家	批号	抽样省份	α/β	平均 α/β	RSD/%
1		1012337-2	山东	3.1		
2		1010206-2	吉林	2.3		
3		1012337-1	吉林	3.1		
4		1010220-2	四川	3.1		
5		1012337-2	吉林	3.1		
6	A	1010220-2	湖南	3.1	2.9	12.7
7		1010220-2	吉林	3.1		
8		1002211-1	辽宁	2.6		
9		1012337-3	山西	3.1		
10		1012337-3	吉林	3.1		
11		1008213-2	山西	2.1		
12		1104302-1	甘肃	3.1		
13		100710102	新疆	3.3		
14	B	110310101	湖南	2.8	3.0	11.2
15		100910101	新疆	3.4		
16		110310101	安徽	2.7		
17		10102603	重庆	3.0		
18	C	10102504	新疆	2.9	3.0	4.0
19		11010804	广西	3.1		
20		10120101	湖南	2.6		
21		10110104	安徽	2.4		
22	D	10070301	辽宁	2.3	2.5	5.2
23		11040103	安徽	2.5		
24		11040104	河南	2.6		
25		11011111	江西	2.2		
26	E	201007022	湖北	2.2	2.5	22.3
27		11011112	湖北	2.2		
28		201011054	安徽	3.3		
29		DP1005001-2	浙江	2.7		
30	F	DP1008001-2	浙江	2.6	2.6	1.9
31		DP1008001-2	浙江	2.6		
32		10122046	山西	3.1		
33		10122046	重庆	3.2		
34	G	10122047	河南	3.1	3.1	1.1
35		11032005	河南	3.1		
36		10122046	湖南	3.1		
37		100901	河南	2.2		
38		100903	四川	2.2		
39	H	100902	四川	2.2	2.2	0.4
40		100901	四川	2.2		
41		100901	辽宁	2.2		
42		100401	山西	2.2		
43		110201	山西	2.2		
44	I	100401	甘肃	2.2	2.3	4.5
45		110301	湖北	2.4		
46		110201	安徽	2.2		
47	J	20101211-A	山西	3.1	3.1	-
48	K	100802	吉林	3.0	3.0	-
49		100803 010	贵州	3.0		
50	L	100801 2	四川	2.0	2.0	-
51	M	1004185	四川	3.7	3.7	-
52	N	1012011	安徽	2.6	2.6	-
53	O	100906-7	贵州	2.0	2.3	-
54		100638-6	云南	2.6		
55	P	20110119	甘肃	2.1	2.1	-

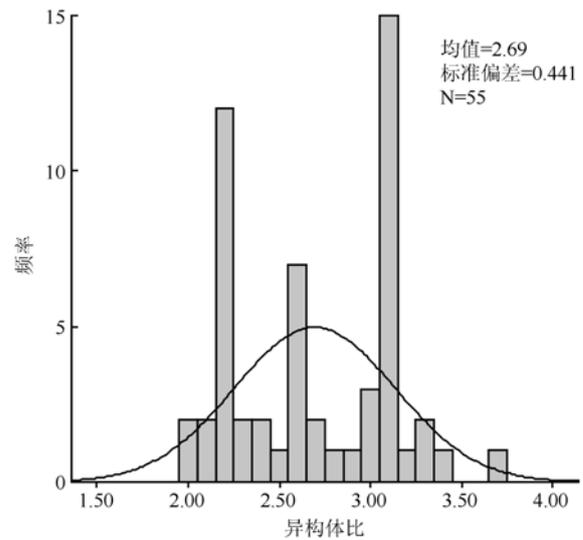


图3 频次分析图

Fig 3 Frequency analysis diagram

国内药企对甘草酸制剂的研发已从最初的甘草混合提取物、第一代甘草酸制剂甘草甜素片、第二代以 β 体甘草酸单铵盐为主要成分的复方甘草酸苷制剂, 开发出了第三代甘草酸制剂 α 体和 β 体混和的甘草酸二铵盐和第四代甘草酸制剂—— α 体的异甘草酸镁。从制剂开发历程来看, α 体甘草酸盐的疗效可能要好于 β 体, 因此在注射用甘草酸二铵由单铵盐合成二铵盐的工艺过程中, 控制 α 体和 β 体的转型显得十分重要。

REFERENCES

- [1] YU F, LIU, DONG L P. Protective effect of α -diammonium glycyrrhizinate phosphatidylcholine complex against acute hepatic injury in mice [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2006, 11(10): 1185-1189.
- [2] WU X M, LU J, LI B R. Therapeutic effects of epimeric glycyrrhizic acids on hepatic injury in rats [J]. Acta Pharm Sin (中国药理学报), 1992, 13(4): 370-374.
- [3] GUO W, CHEN X H, JING C J, et al. Simultaneous determination of epimer of glycyrrhizic acid in Radix Glycyrrhizae by RP-HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2008, 25(11): 892-896.
- [4] LV Z Y, LV Y G, CHE B Q, et al. HPLC determination of 18 α - and 18 β -glycyrrhizin for quality control of glycyrrhizin products [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2010, 30(12): 2372-2376.
- [5] WANG P, LIU X Y, WU X M. Determination of two 18-epimers of glycyrrhizin by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药业), 2008, 17(19): 17-18.
- [6] EP 7.0(欧洲药典 7.0 版)[S].

收稿日期: 2012-07-12