

国家标准样品长期稳定性与加速稳定性的比较

马玉翠¹, 吴翠¹, 王尉², 王淳¹, 杜宁², 吴晓毅¹, 李春¹, 巢志茂^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

[摘要] **目的:**探索天然产物标准样品的长期稳定性和加速稳定性之间的关系,为标准样品的有效期确定提供必要的技术支持。**方法:**在研制5个国家标准样品(肉桂醛、樱花素、长梗冬青苷、水苏糖和 β -谷甾醇)的过程中,将置于0~8℃条件下的样品,分别于第0,1,2,3,6,9,12,18,24个月测定各标准样品的纯度,进行长期稳定性检验。将置于温度(40±2)℃和相对湿度(75±5)%条件下的样品,分别于第0,1,2,3,6个月时测定各标准样品的纯度,进行加速稳定性检验。**结果:**统计分析的结果显示,长期稳定性检验和加速稳定性检验的稳定性均良好,二者之间无显著性差异。**结论:**天然产物标准样品24个月的有效期可通过6个月的加速稳定性检验进行预判。

[关键词] 标准样品; 加速稳定性; 长期稳定性; 有效期

[中图分类号] R284;R283.6;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0051-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200051

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1011.004.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:11

Comparison of Long-term Stability and Acceleration Stability of Certified Reference Materials

MA Yu-cui¹, WU Cui¹, WANG Wei², WANG Chun¹, DU Ning², WU Xiao-yi¹, LI Chun¹, CHAO Zhi-mao^{1*}

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*
2. *Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship between long-term stability and accelerated stability of certified reference materials (CRMs) of natural products, in order to provide technical support for the prediction of validity of CRMs. **Method:** In the process of development of 5 CRMs (cinnamaldehyde, sakuranetin, pedunculoside, stachyose and β -sitosterol), the long-term stability test was carried out by determining their purities at 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 months under the temperature of 0-8℃ and the accelerated stability test was carried out by determining their purities at 0, 1, 2, 3, 6 months under temperature of (40±2)℃ and relative humidity of (75±5)%. **Result:** The results of statistical analysis showed that both long-term stability and accelerated stability were excellent and there were no significant difference between long-term stability and accelerated stability. **Conclusion:** The validity of 24 months of CRMs can be predicted on the bases of the result of accelerated stability test in 6 months.

[Key words] certified reference materials; accelerated stability; long-term stability; validity

获得国家标准化管理委员会颁发的《有证标准 样品证书》的天然产物标准样品,可以保证分析测

[收稿日期] 20170425(018)

[基金项目] 国家质量监督检验检疫总局行业科研专项(201210209);国家标准化管理委员会国家标准样品研制项目(S2012087-S2012091)

[第一作者] 马玉翠,在读硕士,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:15901296328,E-mail:872018483@qq.com

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事天然产物国家标准样品的研制,Tel:13522705161,E-mail:chaozhimao@163.com

试的质量,具有可溯源性、准确性与合法性,是天然产物及其产品的质量控制在必不可少标准参照物。根据 GB/T 15000.3 标准样品工作导则(3)标准样品《定值的一般原则和统计方法》的原则,在研制天然产物标准样品的过程中,长期稳定性是与标准样品在生产者的贮存条件下的行为有关的,是在指定的贮存条件下获得的。长期稳定性检验是天然产物国家标准样品研制中的一个重要环节,其时间长度就是该标准样品的有效期^[1]。

药品的稳定性试验,是在接近药品的实际贮存条件下进行的,可为制订药品的有效期提供依据^[2],一般情况下,以长期试验的结果为依据,取长期试验中与 0 月数据相比无明显改变的最长时间点为有效期^[3]。但是,对于药品来说,在加速条件下进行的加速稳定性试验,可以在较短的时间内,了解原料或制剂的化学、物理和生物学方面的变化,可为制剂设计、质量评价和包装、运输、贮存条件等提供试验依据,并可初步预测药品的稳定性^[4]。在新药申报阶段,仿制药的申请需呈交 40 ℃ 和相对湿度 75% 的条件下 3 个月的数据,即可得到 24 个月的临时有效期。除仿制药外,国家食品药品监督管理局(CFDA)规定可将加速试验数据作为有效期的参考^[5]。对于申报临床研究的新药,也要求提供 6 个月的加速试验资料^[6]。而对于天然产物标准样品,能否引入加速稳定性的概念,加速稳定性检验与长期稳定性检验之间又具有怎样的相关性,能否通过 6 个月的加速稳定性检验来预判 24 个月的长期稳定性,本实验在肉桂醛等 5 个天然产物标准样品的研制过程中进行了探索性的尝试。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,含 Alltech 2000ES 型正发光散射检测器,G1322 型在线脱气机,G1311A 型四元泵,G1329A 型自动进样器,G1316A 型柱温箱),CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),LC-166B 型 166 升卡萨帝冰箱(中国海尔集团),MJX-150B 型恒温恒湿冰箱(天津泰斯特仪器有限公司),YC-D207 型超声加湿器(北京亚都科技股份有限公司)。

肉桂醛系从植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥茎皮中分离精制而得,立项编号 S2012090^[7-8]。樱花素系从杨柳科杨属植物毛白杨 *Populus tomentosa* 的新鲜树皮中分离精制而得,立项编号

S2012088^[9-10]。长梗冬青苷系从冬青科植物铁冬青 *Ilex rotunda* 的树皮中分离精制而得,立项编号为 S2012087^[11-13]。水苏糖系从银条 *Stachys floridana* 的地下茎提取物经发酵精制而得,立项编号 S2012091^[14-15]。 β -谷甾醇系从十字花科植物白芥 *Sinapis alba* 的干燥成熟种子中分离精制而得,立项编号 S2012089^[16-17]。水为重蒸水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 包装 肉桂醛封装于棕色塑料样品瓶中,充氮气,锡箔膜袋包装,每个包装 20 mg。樱花素、长梗冬青苷、水苏糖和 β -谷甾醇均封装于 2 mL 棕色玻璃样品瓶中,每个包装分别为 5, 5, 10, 10 mg。

2.2 外观描述 在检测样品纯度时,观察每个样品的外观。结果认为每个测定点时的样品外观均与分装前的一致。肉桂醛为黄色黏稠状液体,樱花素为无色针状结晶,长梗冬青苷为白色粉末,水苏糖为无色块状结晶, β -谷甾醇为白色柔软柱状晶体。

2.3 色谱条件

2.3.1 肉桂醛 采用迪马 Diamonsil-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相乙腈-水(35:65),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 283 nm,进样量 10 μ L。

2.3.2 樱花素 采用迪马 Diamonsil-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相甲醇-水(60:40),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 288 nm,进样量 10 μ L。

2.3.3 长梗冬青苷 迪马 Diamonsil-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相乙腈-水(32:68),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 210 nm,进样量 20 μ L。

2.3.4 水苏糖 Prevail Carbonhydrate ES 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相乙腈-水(65:35),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃;ELSD 条件为漂移管温度 95 ℃,载气流速 2.5 mL·min⁻¹,进样量 5 μ L。

2.3.5 β -谷甾醇 采用 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇-水(99:1),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃;ELSD 条件为漂移管温度 80 ℃,载气流速 1.6 L·min⁻¹,进样量 10 μ L。

2.4 样品溶液配制 精密称取肉桂醛样品 1 mg,加乙腈定容于 10 mL 量瓶中,经过 0.45 μ m 微孔滤膜,得 0.1 g·L⁻¹ 样品溶液。精密称取樱花素样品

5 mg,加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,得 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液。精密称取长梗冬青苷样品 5 mg,加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,得 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液。精密称取水苏糖样品 1 mg,加乙腈溶解并定容于 10 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,得 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液。精密称取 β -谷甾醇样品 1 mg,加甲醇定容于 5 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,得 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液。

2.5 长期稳定性检验 根据 GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)《标准样品定值的一般原则和统计方法》第 8 章进行稳定性研究的要求^[1],将样品置于 0~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的冰箱中放置 2 年,分别于分装之日起第 0,1,2,3,6,9,12,18,24 个月,随机取出 3 个样品进行纯度的测定。5 个标准样品的长期稳定性检验的纯度结果见表 1 和图 1。由趋势线可知,各样品每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低。

表 1 5 个标准样品的长期稳定性检验

Table 1 Long-term stability test of 5 certified reference materials

<i>t</i> /月	肉桂醛	樱花素	长梗冬青苷	水苏糖	β -谷甾醇
0	98.48,98.50,98.49	99.98,99.98,99.97	99.63,99.59,99.61	99.71,99.73,99.74	95.51,95.69,95.40
1	98.44,98.42,98.51	99.96,99.97,99.96	99.62,99.59,99.62	99.70,99.66,99.73	95.62,95.51,95.76
2	98.67,98.64,98.73	99.97,99.98,99.97	99.64,99.73,99.69	99.67,99.72,99.73	95.63,95.65,95.66
3	98.47,98.56,98.50	99.98,99.98,99.98	99.62,99.62,99.63	99.71,99.79,99.68	95.42,95.45,95.37
6	98.47,98.45,98.53	99.98,99.98,99.97	99.52,99.57,99.59	99.76,99.67,99.73	95.88,95.52,95.56
9	98.48,98.55,98.39	99.98,99.97,99.97	99.53,99.54,99.52	99.67,99.70,99.69	95.47,95.52,95.30
12	98.49,98.38,98.49	99.98,99.98,99.98	99.62,99.59,99.63	99.69,99.68,99.76	95.47,95.50,95.38
18	98.49,98.51,98.43	99.98,99.98,99.96	99.62,99.63,99.58	99.72,99.68,99.75	95.32,95.63,95.76
24	98.49,98.42,98.34	99.98,99.96,99.97	99.64,99.64,99.63	99.72,99.73,99.75	95.56,95.40,95.70

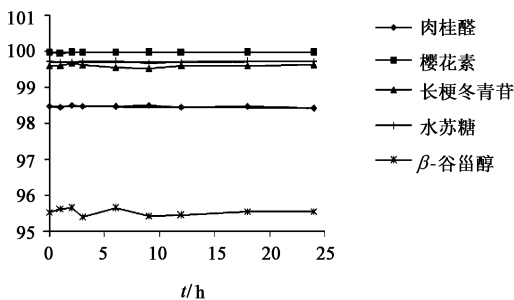


图 1 5 个标准样品长期稳定性检验 0~24 月的趋势线 ($n=3$)

Fig. 1 Trend lines from 0 to 24 months of long-term stability test of 5 certified reference materials ($n=3$)

2.6 加速稳定性检验 根据 1992 年卫生部发布的新药审批办法《有关中药部分的修订和补充规定》对新药加速试验的规定,采用的贮存条件为 40 $^{\circ}\text{C}$ 和相对湿度 75%^[5]。每个标准样品各取 20 个样品瓶,放置于恒温恒湿箱中。调节温度(40 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(75 \pm 5)% 的条件下放置 6 个月,分别于分装之日起第 0,1,2,3,6 个月时取 3 瓶样品进行纯度测定。加速稳定性检验的纯度结果见表 2 和图 2。由趋势线可知,各样品每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低。

表 2 5 个标准样品的加速稳定性检验

Table 2 Accelerated stability test of 5 certified reference materials

<i>t</i> /月	肉桂醛	樱花素	长梗冬青苷	水苏糖	β -谷甾醇
0	98.48,98.50,98.49	99.98,99.98,99.97	99.63,99.59,99.61	99.71,99.73,99.74	95.51,95.69,95.40
1	98.44,98.42,98.52	99.97,99.97,99.97	99.65,99.60,99.70	99.79,99.69,99.67	95.66,95.45,95.58
2	98.49,98.43,98.50	99.98,99.97,99.97	99.68,99.69,99.78	99.72,99.68,99.73	95.66,95.66,95.61
3	98.50,98.44,98.48	99.98,99.98,99.98	99.64,99.64,99.63	99.76,99.71,99.68	95.43,95.38,95.40
6	98.43,98.51,98.43	99.97,99.97,99.97	99.74,99.52,99.61	99.69,99.74,99.70	95.56,95.49,95.55

2.7 稳定性的 t 检验和 F 检验^[8,10,13,15,17] 根据 GB/T 15000.3-2008 标准样品工作导则(3)《标准样

品定值的一般原则和统计方法》的要求,以直线模型为经验模型,对通过 HPLC 测得的各样品稳定性

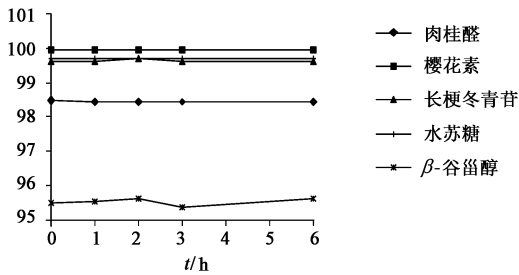


图 2 5 个标准样品加速稳定性检验 0~6 月的趋势线 ($n=3$)
Fig. 2 Trend lines from 0 to 6 months of accelerated stability of 5 certified reference materials ($n=3$)

检验的纯度值进行 t 检验和 F 检验, 结果见表 3, 4。

表 3 5 个标准样品稳定性的 t 检验

标准样品	加速稳定性		长期稳定性	
	$ b_1 $	$t_{0.95, n-2} s(b_1)$	$ b_1 $	$t_{0.95, n-2} s(b_1)$
肉桂醛	0.003 96	0.005 01	0.001 900	0.002 3
樱花素	0.000 85	0.004 08	0.000 091	0.000 9
长梗冬青苷	0.001 64	0.032 98	0.000 145	0.004 7
水苏糖	0.002 64	0.006 76	0.000 315	0.001 7
β -谷甾醇	0.007 74	0.067 00	0.001 400	0.010 0

注: $|b_1|$ 表示直线斜率。

表 4 5 个标准样品稳定性的 F 检验

标准样品	加速稳定性			长期稳定性		
	F	$F_{0.05}(1, 4)$	$u_{\text{sis}}/\%$	F	$F_{0.05}(1, 7)$	$u_{\text{lis}}/\%$
肉桂醛	6.785		0.009	4.548		0.020
樱花素	0.438		0.010	0.080		0.010
长梗冬青苷	0.025	7.71	0.060	0.005	5.59	0.040
水苏糖	3.360		0.013	0.244		0.017
β -谷甾醇	0.133		0.130	0.116		0.100

注: u_{sis} 和 u_{lis} 分别表示加速稳定性的不确定度、长期稳定性的不确定度。

自由度为 $n-2$ 和 $P=0.95$ (95% 置信水平) 的 t 因子等于 2.37。由于 5 个标准样品加速稳定性和长期稳定性的 t 检验结果为 $|b_1| < t_{0.95, n-2} \times s(b_1)$, $s(b_1)$ 为 b_1 的标准偏差, 故斜率是不显著的, 未观测到不稳定性, 可以确定这些标准样品在温度 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和相对湿度 $(75 \pm 5)\%$ 的加速稳定性条件下, 在 6 个月内是稳定的; 在 $0 \sim 8^\circ\text{C}$ 的长期稳定性条件下, 在 24 个月内是稳定的。说明在这 2 种稳定性条件下, 这 5 个标准样品的稳定性均良好。

线性回归的方差分析认为, 加速稳定性检验和长期稳定性检验的直线回归方程的拟合度均较好。

加速稳定性经直线回归的方差分析得到的 F 小于 $F_{0.05}(1, 4) = 7.71$, 故可以确定 5 个标准样品在温度 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和相对湿度 $(75 \pm 5)\%$ 的条件下, 在 6 个月内是稳定的。长期稳定性经直线回归的方差分析得到 F 小于 $F_{0.05}(1, 7) = 5.59$, 故可确定 5 个标准样品在 $0 \sim 8^\circ\text{C}$ 的条件下, 在 24 个月内是稳定的。

2.8 两独立样本的 Mann-Whitney U 检验^[18] 假设加速稳定性检验和长期稳定性检验之间的稳定性无差异, 利用 SPSS 20.0 软件对加速稳定性和长期稳定性 2 个独立样本进行 Mann-Whitney U 分析, 得两者之间的关系。结果肉桂醛、樱花素、长梗冬青苷、水苏糖和 β -谷甾醇 Mann-Whitney U 检验的显著性水平分别为 0.699 3, 1, 0.111 9, 0.898 1, 0.898 1, 均 > 0.05 , 故不拒绝原假设, 保留原假设, 故认为五者加速稳定性检验和长期稳定性检验的稳定性无差异。

3 讨论

本文的 5 个天然产物标准样品, 同时进行了长期稳定性、加速稳定性的纯度测定, 并进行了趋势分析, 测定时间内未见随时间的变化而明显升高或降低的现象; t 检验和 F 检验均得到了通过。进一步的 Mann-Whitney U 检验认为, 各样品的长期稳定性检验和加速稳定性检验之间无显著性差异。

在已经研制成功的天然产物国家标准样品中, 海藻糖^[19]、角鲨烯^[20]、岩藻黄质^[21]、硫酸氨基葡萄糖^[22]、甘草酸^[23]、松果菊苷^[24] 和 4,9-脱水河豚毒素^[25] 进行了 12 或 24 个月的长期稳定性检验, 河豚毒素进行了 6 个月 40°C 的加速稳定性检验^[26], 牛蒡子苷进行了 2 周短期稳定性检验及 24 个月的长期稳定性检验^[27], 均没有同时进行长期稳定性和加速稳定性的相关性检验, 说明本文对稳定性检验的报道具有一定的创新性。

鉴于在药品和保健食品的申报中, 3 个月或 6 个月的加速稳定性检验可以反映产品 24 个月的长期稳定性, 因此, 笔者建议在天然产物国家标准样品的研制过程中, 可以采用最长 6 个月的加速稳定性检验来预判 24 个月的长期稳定性。当前, 只有更多、更快地研制和采用标准样品, 才能保证检测结果在国际交往中的准确性、可比性、可溯源性。随着医药工业高科技和经济的发展, 产品更新换代周期短, 为了适应市场竞争激烈的新形势, 同时为了能快速解决我国植物提取行业、保健品行业、食品行业、化妆品行业等领域标准样品极度缺乏, 并严重影响产品质量控制和质量检测的问题, 建议采用加速稳定

性检验的数据来预判标准样品的有效期,这将具有更现实的操作意义,希望该建议能被 GB/T 15000.3 下一版文字标准采纳,这样可能会有助于我国天然产物标准样品的快速发展。

[参考文献]

[1] GB/T 15000.3-2008, 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[2] 杨仲文. 新药美洛昔康原料及片剂的质量研究[D]. 武汉:湖北大学,2000.

[3] 熊颖,吴雪茹,涂兴明. 十味骨康口服液的稳定性研究[J]. 国际医药卫生导报,2011,17(17):2079-2082.

[4] 姜程曦,王晓慧,赵秋月,等. 温莪术贮藏过程中质量稳定性研究[J]. 北方园艺,2009,33(11):208-211.

[5] 王弘,刘皈阳,张燕平. 药品稳定性实验研究进展[J]. 中国新药杂志,2006,15(20):1710-1715.

[6] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物稳定性研究技术指导原则[EB/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0055/10637.html>,2006-12-30.

[7] 王金,巢志茂,王秀娟,等. 羧基和甲氧基取代苯甲醛在亚硫酸氢钠-乙酸乙酯-水两相中分配系数的测定[J]. 中国药学杂志,2011,46(13):1034-1037.

[8] 马玉翠,吴翠,王尉,等. 肉桂醛标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):67-71.

[9] 刘海萍,巢志茂,吴晓毅,等. 毛白杨化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(10):1422-1425.

[10] 马玉翠,吴翠,王尉,等. 樱花素标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(9):51-56.

[11] WANG C, CHAO Z, WU X, et al. Enrichment and purification of pedunculoside and syringin from the barks of *Ilex rotunda* with macroporous resins [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol,2014,37(4):572-587.

[12] WANG C, CHAO Z, SUN W, et al. Isolation of five glycosides from the barks of *Ilex rotunda* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Liq Chromatogr

Relat Technol,2014,37(16):2363-2376.

[13] 马玉翠,王淳,王尉,等. 长梗冬青苷标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(12):65-70.

[14] WU X Y, CHAO Z M, WANG C, et al. Extraction and absolute crystal structure of stachyose [J]. Chin J Struct Chem,2014,33(1):65-70.

[15] 马玉翠,王淳,王尉,等. 水苏糖标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):68-73.

[16] WU X, CHAO Z, WANG C, et al. Extraction and crystal structure of β -sitosterol [J]. Chin J Stru Chem,2014,33(5):801-806.

[17] 马玉翠,吴晓毅,王尉,等. β -谷甾醇标准样品的研制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(16):90-95.

[18] 周登远. 临床医学研究中的统计分析和图形表达实例详解[M]. 北京:军事医学科学出版社,2011:77.

[19] 陈晖,方华,张怡评,等. 海藻糖标准样品的研制[J]. 化学分析计量,2015,24(1):1-4.

[20] 陈伟珠,晋文慧,方华,等. 角鲨烯国家标准样品的研制[J]. 食品科学,2015,36(12):166-170.

[21] 张怡评,陈伟珠,方华,等. 岩藻黄质标准样品的研制[J]. 化学分析计量,2015,24(6):1-5.

[22] 陈伟珠,张怡评,方华,等. 硫酸氨基葡萄糖标准样品的研制[J]. 化学分析计量,2015,24(2):1-5.

[23] 王岱杰,周晓晶,王尉,等. 甘草酸标准样品的研制[J]. 山东科学,2014,27(4):25-32.

[24] 王婷婷,赵敏,王岱杰,等. 松果菊苷标准样品的研制[J]. 山东科学,2016,29(1):14-20.

[25] 陈伟珠,谢全灵,张怡评,等. 4,9-脱水河豚毒素国家标准样品的研制[J]. 化学分析计量,2014,23(3):1-4.

[26] 陈伟珠,易瑞灶,谢全灵,等. 河豚毒素标准样品的研制[J]. 化学分析计量,2010,19(2):7-11.

[27] 郑振佳,张敏,王晓,等. 牛蒡子苷标准样品的研制[J]. 标准科学,2015,52(11):67-72.

[责任编辑 刘德文]