

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.013

注射用前列地尔干乳剂中甲氧基苯胺值测定方法的建立*

李 潇, 郭 雷, 游 畅, 白亦昊, 邵天舒, 张建敏, 王 静, 邵昭慧, 丁 锐[△], 周长明

(北京市药品检验所·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立注射用前列地尔干乳剂中甲氧基苯胺值的测定方法。方法 样品以三氟乙酸破乳,用异辛烷溶解,60℃下水浴旋蒸15 min;残渣以异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)溶解,与4-甲氧基苯胺反应,于350 nm波长处测定吸光度,并计算甲氧基苯胺值。结果 甲氧基苯胺质量浓度在0.6~2.4 μg/mL范围内与吸光度线性关系良好,检测限为0.2 μg/mL,耐用性试验的RSD为4.67%(n=5)。结论 所建立的方法操作简便、准确,可用于注射用前列地尔干乳剂中甲氧基苯胺值的测定。

关键词:甲氧基苯胺值;注射用前列地尔;破乳;测定方法

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)10-0051-03

Establishment of a Method for Determination of Anisidine Value in Alprostadil Dried Emulsion for Injection

LI Xiao, GUO Lei, YOU Chang, BAI Yihao, SHAO Tianshu, ZHANG Jianmin, WANG Jing, GAO Zhaohui, DING Rui, ZHOU Changming

(Beijing Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of anisidine value in Alprostadil Dried Emulsion for Injection. Methods The sample was demulsified by adding trifluoroacetic acid, dissolved with isooctane, and rotary evaporated in a water bath at 60℃ for 15 min. The residue was dissolved with isopropanol-isooctane (2:8, V/V) and reacted with 4-methoxyaniline. The absorbance was measured at 350 nm and the anisidine value was calculated. Results The linear range of anisidine was 0.6-2.4 μg/mL, the limit of detection (LOD) was 0.2 μg/mL. The RSD of the durability test was 4.67% (n=5). Conclusion The method is simple and accurate, which can be used for the determination of anisidine value in Alprostadil Dried Emulsion for Injection.

Key words: anisidine value; Alprostadil Dried Emulsion for Injection; demulsification; determination method

难溶性药物多具有亲脂性,将其溶于适宜的油相中制成载药乳,可有效提高其溶解度^[1]。静脉注射用乳剂

常被用作药物载体^[2],但易氧化降解、稳定性差,冻干技术应用于载药微乳制剂,有利于制剂的稳定^[3]。脂肪乳

*基金项目:国家药典委员会药品标准提高项目[341]。

第一作者:李潇,女,硕士研究生,药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)jesscy@aliyun.com。

[△]通信作者:丁锐,男,大学本科,副主任药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)18010281136@163.com。

62%,液料比18:1,验证试验结果表明,在此条件下总香豆素得率与理论预测值基本一致。

山蜡梅叶中主要含有黄酮、香豆素类成分,其中香豆素类具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌及松弛平滑肌、抗凝血等药理作用^[9-12],该成分也是评价山蜡梅叶药材质量的重要依据。因此,本试验中选择香豆素类成分总香豆素的得率为评价指标。

综上所述,优选的提取工艺操作简便、稳定可行,可用于山蜡梅叶总香豆素的提取。

参考文献

- [1] 李治光,卢建中,陈杰,等.江西道地药材山蜡梅叶质量标准的研究[J].中草药,2010,41(5):836-838.
- [2] 刘婧,黄平.德兴山蜡梅叶的生药学研究[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(37):276-277.
- [3] 孙春红.山蜡梅叶化学成分及其乙酰胆碱酯酶抑制活性研究进展[D].南昌:江西师范大学,2015.
- [4] 黄赞兴,舒任庚.山蜡梅叶化学成分研究[J].中药材,2017,

40(12):2856-2858.

- [5] 张尊敬,刘忠达.山蜡梅的成分及药理作用研究近况[J].浙江中医杂志,2009,44(11):849-850.
- [6] 张等宏,陈娥,肖春芳,等.瑞香狼毒根中总香豆素的提取工艺研究[J].湖北农业科学,2017,56(12):2329-2331.
- [7] 牛四坤.超声辅助提取金耳香豆素的工艺优化[J].山西农业科学,2019,47(8):1493-1496.
- [8] 张国铎,李航.香豆素类化合物的药理作用研究进展[J].中国药业,2011,20(17):1-3.
- [9] 李帅岚,邹峥嵘.蜡梅属植物中黄酮和香豆素类成分及药理活性研究进展[J].中草药,2018,49(14):3425-3431.
- [10] 刘霞,于红梅,李东花.关于抗HIV活性香豆素类化合物进展的探究[J].中国伤残医学,2014,22(6):326-327.
- [11] 黄月芬.香豆素类化合物在肿瘤治疗上的应用[J].海峡药学,2015,27(8):1-4.
- [12] 孔令雷,胡金凤,陈乃宏.香豆素类化合物药理和毒理作用的研究进展[J].中国药理学通报,2012,28(2):165-168.

(收稿日期:2020-09-17;修回日期:2020-11-20)

中的油相在制备过程中极易分解为醛、酮、酸等,易引起临床用药的安全隐患^[1]。前列地尔临床多被用于改善心脑血管微循环障碍,以及脏器移植术后的抗栓治疗等^[4]。注射用前列地尔干乳剂为前列地尔无菌冻干乳剂,使用时加水溶解后为白色或类白色乳液,其辅料为大豆油及甘油。预试验中发现,以三氟乙酸为破乳剂可使油相更好地释放,有助于甲氧基苯胺值的测定。本研究中建立了专属性和耐用性均良好的测定注射用前列地尔干乳剂中甲氧基苯胺值的方法^[15-6]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);Rotavapor R-3 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);MEGAFUGE8 型低速离心机(美国 ThermoScientific 公司);KQ-500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

注射用前列地尔干乳剂(A 企业,批号分别为 13102864, 13102525, 14100265, 13102843, 14012040, 15010091);4-甲氧基苯胺(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号为#BVBW9024,含量为 99%);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

避光操作,取样品 5 瓶(规格为 10 μg)或 10 瓶(规格为 5 μg)内容物,置 25 mL 容量瓶中,加水 5 mL 使复乳,加入三氟乙酸 2 mL,振摇约 1 min 使破乳,用异辛烷定容,振摇提取约 1 min,2 000 r/min 离心 5 min;取异辛烷层置圆底烧瓶中,并置 60 °C 水浴中减压旋转蒸发 15 min,将残渣用异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)适量溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,用异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)定容,摇匀,即得供试品溶液。按注射用前列地尔处方,制备缺油相的空白对照溶液。取 4-甲氧基苯胺 125 mg,精密称定,置 50 mL 棕色容量瓶中,用冰醋酸超声(功率 500 W,频率 40 kHz)溶解,并定容,即得 0.25% 4-甲氧基苯胺冰醋酸溶液,遮光放置,临用现配。

2.2 测定方法

精密量取异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)与供试品溶液各 5 mL,分别置甲、乙 2 支具塞试管中,分别精密加入 0.25% 4-甲氧基苯胺冰醋酸溶液 1 mL,密塞,摇匀,避光准确放置 10 min,以异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)为空白,在 350 nm 波长处分别测定吸光度 A_1 和 A_2 ;另取供试品溶液,以异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)为空白,在 350 nm 波长处测定吸光度 A_0 。按下列公式计算得本品的甲氧基苯胺值拟定限度为 5.0。

$$\text{甲氧基苯胺值} = 25 \times [1.2 \times (A_2 - A_1) - A_0] / W$$

式中, A_1 为空白溶剂反应后的吸光度; A_2 为供试品溶液反应后的吸光度; A_0 为供试品溶液未反应的吸光度; 1.2 为加入 4-甲氧基苯胺冰醋酸溶液后的溶液稀释因子; W 为供试品溶液中的油相质量(g),结合本品处方折算后以 0.75 计。

2.3 专属性试验

取空白对照溶液 5 mL,置 25 mL 容量瓶中,按 2.2 项下“加入 2 mL 三氟乙酸……”起,同法操作,并计算甲氧基苯胺值。不含油相的处方组分混合后测定的甲氧基苯胺值为 0.003 3,远低于国家药典委员会公示的脂肪乳相关品种标准中甲氧基苯胺值的限度^[7-9],表明方法专属性良好。

2.4 线性关系与检测限考察

取供试品 5, 15, 25, 35, 45, 50, 60 μg, 分别置 25 mL 容量瓶中,同 2.1 项下方法制成系列供试品溶液。按 2.2 项下“加入 2 mL 三氟乙酸……”起,同法操作,以甲氧基苯胺值(A)为纵坐标、供试品中油相的量(W)为横坐标进行线性回归。结果,待测溶液质量浓度在 0.2 ~ 2.4 μg/mL 范围内的线性回归方程为 $A = 0.5562W + 0.0485$ ($r^2 = 0.9637$, $n = 7$),在 0.6 ~ 2.4 μg/mL 范围内的线性回归方程为 $A = 0.6361W - 0.0058$ ($r^2 = 0.9902$, $n = 7$),表明甲氧基苯胺质量浓度在 0.6 ~ 2.4 μg/mL 范围内与吸光度线性关系良好;在 0.2 μg/mL 时偏离线性,但仍可检出。总的来看,检测限约为 0.2 μg/mL,灵敏度良好。详见表 1。

表 1 线性关系及检测限考察结果

质量浓度(μg/mL)	油相质量(g)	A_0	A_1	A_2	$A_2 - A_1$	A
0.2	0.075	0.009 1	0.012 0	0.023 2	0.011 2	0.14
0.6	0.225	0.021 8	0.012 0	0.033 9	0.021 9	0.15
1.0	0.375	0.037 3	0.012 0	0.048 4	0.036 4	0.21
1.4	0.525	0.039 3	0.012 0	0.053 3	0.041 3	0.34
1.8	0.675	0.054 4	0.012 0	0.068 4	0.056 4	0.44
2.0	0.750	0.064 1	0.012 0	0.077 2	0.065 2	0.47
2.4	0.900	0.072 2	0.012 0	0.086 2	0.074 2	0.56

2.5 耐用性试验

称取样品适量,精密称定,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2 项下试验条件[分别设置旋蒸温度和时间: 55 °C 10 min、55 °C 20 min、65 °C 10 min、65 °C 20 min]进样测定,记录吸光度,并计算甲氧基苯胺值。结果见表 2。可见,旋蒸温度和时间发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.6 样品中甲氧基苯胺值测定

取 6 批样品各适量,分别按 2.1 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2 项下方法测定,平行测定 3 次,记录吸

表2 耐用性试验结果
Tab. 2 Results of the durability test

试验条件	甲氧基苯胺值	$\bar{X}$	SD	RSD(%)
60 °C 15 min(正常条件)	0.62			
65 °C 10 min	0.57			
65 °C 20 min	0.60	0.60	0.028	4.67
55 °C 10 min	0.63			
55 °C 20 min	0.57			

表3 样品中甲氧基苯胺值测定结果($n=3$)

Tab. 3 Content determination of anisidine value in Alprostadil Dried Emulsion for Injection($n=3$)

批号	规格(μg)	甲氧基苯胺值	批号	规格(μg)	甲氧基苯胺值
13102864	10	4.85	13102843	5	4.81
13102525	10	4.91	14012040	10	3.73
14100265	5	4.62	15010091	5	3.69

光度,并计算甲氧基苯胺值。结果见表3。

3 讨论

甲氧基苯胺值常被用于评价油脂中的次级氧化产物水平,是脂肪乳质量控制的重要指标^[10]。现行版英国药典及美国药典中,均收录了甲氧基苯胺值的测定方法:取供试品,用异辛烷溶解后,与4-甲氧基苯胺发生反应,并在350 nm波长处测定吸光度,计算,即得。此外,由于4-甲氧基苯胺的光敏性,因此均要求避光操作^[11-12]。

脂肪乳是将脂质以小液滴状分散在水中形成的非均相的水包油型乳剂。市售脂肪乳主要是静脉注射类,其中脂质成分主要是大豆油^[13]。脂肪乳能明显提高疏水药物在水溶液中的溶解度,从而增加药物的生物利用度^[14]。注射用前列地尔干乳剂主要含有甘油和大豆油。目前,国家药典委员会公示的脂肪乳相关品种标准中,甲氧基苯胺值的限度标准有3.0及5.0^[17-9]。本研究中样品的油相质量均远小于其他乳剂产品,参考上述标准,将本品的甲氧基苯胺值限度定为不得过5.0。在该限度下,患者接触到的醛、酮类等有害物质的量仍远小于其他乳剂产品,可以保证本品具有良好的安全性。国家药典委员会于2015年6月15日公示的《丙泊酚乳状注射液质量标准(征求意见稿)》中,将供试品溶于无水乙醇后,反复旋蒸除尽水分,再用异丙醇-异辛烷(2:8, V/V)溶解后进行测定。此方法需要对无水乙醇反复旋蒸,以除尽水分,比较麻烦。本研究中参考相关文献,并结合本品的剂型特点,建立了适于本品中甲氧基苯胺值的检测方法。高速离心、高压电场或添加破乳剂均可使乳液失稳^[15],且高速离心或高压电场对设备也有一定要求,因此本研究中选择了相对简单的方法,即加破乳剂。醛、酮类物质产生于油相中,而本品为水包油型乳剂,因此加入三氟乙酸后,乳状液被破坏,达到了油、水

两相分离,从而可更好地从油相中提取醛、酮类物质,进行检测。

综上所述,本研究所建立的方法操作简便、准确,可用于注射用前列地尔干乳剂中甲氧基苯胺值的测定。

参考文献

- [1] 周丽梅,曾韶辉,陈颖. 脂肪乳注射液中甲氧基苯胺值检测方法的探讨[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(2):185-188.
- [2] 逯获,任晓文,王博. 载药脂肪乳剂的研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(5):339-343.
- [3] 刘沙,熊非,朱家璧,等. 静脉注射用载药脂肪乳的研究近况[J]. 药学进展,2010,34(3):104-109.
- [4] 周长明,丁锐. 柱切换柱后衍生高效液相色谱法测定前列地尔注射液中主药的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):402-406.
- [5] 周君卓,董武军,刘玉玲. 络合沉淀-紫外分光光度法测定黄芩素脂肪乳中甲氧基苯胺值[J]. 中国现代应用药学,2019,36(24):3019-3022.
- [6] 许文东,蔡鸿飞,刘菊妍,等. 精制橄榄油中甲氧基苯胺值测定方法的改进[J]. 临床医药文献电子杂志,2016,3(45):9054-9055.
- [7] 国家药典委员会. 丙泊酚乳状注射液国家标准(征求意见稿)[EB/OL]. (2015-06-15) [2020-06-25]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080814de6fac1014df4e0288603a7? a=BZHXYYP>.
- [8] 国家药典委员会. 脂肪乳注射液(C14~24)国家标准[EB/OL]. (2017-08-07) [2020-06-25]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080815d083c7f015dba35f5eb2dd2? a=BZHXYYP>.
- [9] 国家药典委员会. 中/长链脂肪乳注射液国家标准公示稿[EB/OL]. (2015-07-08) [2020-06-25]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080814e238d59014e6b3951072091? a=BZHXYYP>.
- [10] 梅丹,李大魁,赵彬. 两厂家市售脂肪乳注射液的质量评价[J]. 中国临床营养杂志,2005,13(2):103-108.
- [11] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia 41[M]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention,2018:6184-6197.
- [12] European Pharmacopoeia Convention. European Pharmacopoeia 9.0[M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare,2017:176.
- [13] MACFIE J. The development of fat emulsion[J]. Nutrition,1999,15(7/8):641-645.
- [14] RANE SS, ANDERSON BD. What determines drug solubility in lipid vehicles: is it predictable[J]. Advanced Drug Delivery Reviews,2008,60(6):638-656.
- [15] IZQUIERDO P, ESQUENA J, THARWARD FT, et al. Phase Behavior and Nano-emulsion Formation by the Phase Inversion Temperature Method[J]. Langmuir, 2004, 20(16): 6594-6598.

(收稿日期:2020-07-27;修回日期:2020-12-20)