

影响复方利巴韦林口服液稳定性的关键因素分析及其制备工艺的优化

邵益丹^{1,2}, 张晶², 方红英², 席建军², 庄让笑², 琚立萍², 范晓辉^{1*} (1.浙江大学, 杭州 310012; 2.杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 分析影响复方利巴韦林口服液稳定性的主要因素, 并开展制备工艺的优化试验, 以确定合理的工艺条件, 提高该产品的质量。方法 通过单因素试验考察中间品溶液 pH、灭菌温度和金属离子对产品稳定性的影响, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方法以确定最优工艺条件, 据此考察产品在加速试验和长期试验中的稳定性。结果 灭菌前中间品溶液的 pH 值对产品稳定性影响最大, 灭菌温度的影响其次, 而金属离子的影响相对较小, 从而选定 $A_3B_2C_2$ 的组合, 即中间品 pH 值 7.0、105 °C/30 min 灭菌并加 0.01% EDTA-2Na 为最佳工艺组合。结论 复方利巴韦林口服液的稳定性受到其中间品溶液 pH 值、灭菌温度和溶液中的金属离子的影响, 且以中间品溶液 pH 值和灭菌温度的影响最甚。为有效控制产品质量, 最终确定复方利巴韦林口服液最佳工艺条件为中间品 pH 值 6.9~7.0, 灭菌参数 105 °C/30 min, 溶媒为纯化水, 并在药液中加入 0.01% EDTA-2Na, 使产品稳定性得到显著提高。

关键词: 利巴韦林; 5-羟甲基戊醛; 酸碱度; 灭菌温度; 金属离子

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0460-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.018

Analysis of the Influencing Factors of Stability of Compound Libavirin Oral Liquid and the Research of Its Optimized Preparation Process

SHAO Yidan^{1,2}, ZHANG jing², FANG Hongying², XI Jianjun², ZHUANG Rangxiao², JU Liping², FAN Xiaohui^{1*} (1.Zhejiang University, Hangzhou 310012, China; 2.Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analysis the influencing factors of stability of compound libavirin oral liquid, and to build up a reasonable preparing method to improve the product's quality. **METHODS** Use single factor tests to study the influences of preparing conditions, including intermediate product's pH value, sterilizing temperature and metal ions, to the product's quality, and to find out the best preparing conditions by the $L_9(3^4)$ orthogonal tests. Then to test the product's accelerated and long term stability. **RESULTS** The orthogonal test results showed that the intermediate product's pH had the most significant impact on the sterilized products' stability. The next influencing factor was the sterilizing temperature and the metal ions had the minimum impact. The best preparing method group was $A_3B_2C_2$ (intermediated product's pH 7.0, sterilizing temperature 105 °C/30 min and add 0.01% EDTA-2Na). **CONCLUSION** The compound libavirin oral liquid's stability is associated with its intermediated product's pH, sterilizing temperature and metal ions. The intermediated product's pH and sterilizing temperature has the major impacts on the product's stability. The final optimized preparing method is pH 6.9~7.0 of intermediated product, 105 °C/30 min sterilizing temperature and adding 0.01% EDTA-2Na into the product. Thus to improve the product's stability.

KEY WORDS: libavirin; 5-hydroxymethylfurfural; pH; sterilization temperature; metal ion

利巴韦林(Ribavirin, RBV)是一种人工合成的抗病毒药物, 用于治疗流行性感、病毒性上呼吸道感染、腮腺炎等疾病^[1]。在售复方利巴韦林口服液的 pH 值、含量和色泽等指标在存放过程中存在着明显的变化, 尤其是 pH 值可以在灭菌后存放很短的时间内下降到 5.0 以下, 超出其质量标准中 pH 5.0~7.0^[1]的下限, 提示该产品质量稳定性存在问题。

复方利巴韦林口服液中的成分包括了利巴韦

林、牛磺酸、蔗糖、水以及防腐剂。经研究发现, 其处方中最不稳定的成分为蔗糖。有资料显示, 蔗糖的水解速率随其溶液酸度的增加而显著增加, 随着温度的升高, 蔗糖的水解速度加快^[2-3]; 溶液中的金属离子, 尤其是多价金属阳离子包括重金属离子的存在可能加速蔗糖的分解; 微生物分泌的酶也会极大地加速蔗糖的分解^[4]。至于蔗糖分解产生的单糖, 包括葡萄糖和果糖, 它们易分解产生 5-HMF^[5]; 5-HMF 易形成聚合物而导致变

作者简介: 邵益丹, 男, 主管药师 Tel: (0571)85463955 E-mail: 40773425@qq.com

*通信作者: 范晓辉, 男, 博士, 教授 Tel:

(0571)88208596 E-mail: fanxh@zju.edu.cn

色,且溶液的色泽深度与聚合物的量成正比^[6];5-HMF可进一步分解产生乙酰丙酸和甲酸(FA)^[5],造成溶液中H⁺增多,pH值下降。而pH值的下降,又可能加快蔗糖以及利巴韦林的分解,导致更多单糖、5-HMF、乙酰丙酸和甲酸的生成以及利巴韦林含量的降低。由此得出影响该产品稳定性的因素和路径。

因此,本研究确定中间品溶液pH值、灭菌温度(30 min)以及溶液中的金属离子浓度为影响该产品稳定性的重要因素。通过对以上三因素三水平的正交试验研究,分析各因素对产品质量的影响,确定最优工艺条件及制备方法,提高复方利巴韦林口服液的质量稳定性。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),色谱柱为 Hibar C₁₈ 键合硅胶柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); PHS-3C 酸度计(上海雷磁仪器厂); BT-25S 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); WD-A 药物稳定性检查仪(天津药典标准仪器厂); LMQ.R 自动立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司)。

利巴韦林对照品(中国药品生物制品检定所,批号:629-200202, HPLC, 外标法,含量 100.0%); 利巴韦林原料药(重庆星湖生物科技有限公司星湖生化制药厂,批号:L101280); 牛磺酸(天津天成制药有限公司,批号:100711); 蔗糖(阿拉丁试剂公司,批号:L1211032); 羟苯乙酯(台山市新宁制药有限公司,批号:2010091); 依地酸二钠(杭州利人药业有限公司,批号:20120710); 氢氧化钠(湖南尔康制药有限公司,药用级); 硫酸镁(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 处方与制备工艺

2.1.1 处方 利巴韦林 10 g, 牛磺酸 50 g, 单糖浆 200 mL, 羟苯乙酯 0.3 g, 纯化水加至 1 000 mL。

2.1.2 制备工艺 按中国药典 2010 年版的方法制备含蔗糖 85% 的单糖浆^[7], 备用。取纯化水 700 mL, 加入羟苯乙酯, 搅拌加热至完全溶解, 再加入牛磺酸和利巴韦林, 搅拌完全溶解, 加单糖浆摇匀, 再加纯化水至足量, 摇匀, 即得。

2.2 质量控制

2.2.1 质量控制标准 pH 值应为 5.0~7.0, 其他均应符合中国药典 2010 版二部附录“口服液剂”项下有关规定^[7]。

2.2.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为水, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 207 nm, 进样量为 20 μL。理论板数按利巴韦林峰计算≥2 500, 色谱见图 1。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 0.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 对照品溶液的制备 取利巴韦林对照品适量, 精密称定 12.5 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含 50 μg 的对照品储备液。

2.2.5 含量测定 精密量取待测溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱, 按外标法以峰面积计算, 即得。结果见图 1。

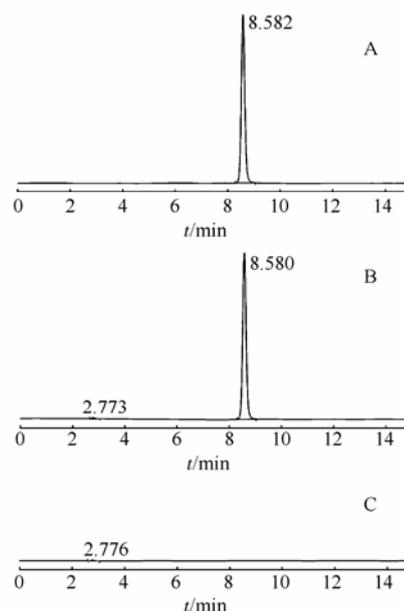


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-空白样品溶液; C-供试品溶液。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-blank; C-sample solution.

2.3 制备工艺条件对稳定性的影响

2.3.1 中间品 pH 值对成品 pH 的影响 观察中间品不同 pH 对灭菌后成品 pH 值影响。灭菌条件为 100 °C/30 min, 纯化水为溶剂, 中间品 pH 值分别调节至 5.0, 6.0 和 7.0。灭菌完毕后, 40 °C/75% RH 条件下加速试验 3 个月, 观察 pH 值的变化情况, 结果显示, 中间品 pH 值调节至 7.0 时, 灭菌后产品的稳定性较好。结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab. 1 Results of sample determination

中间品 pH 值	0 月	1 月	2 月	3 月	差值(D)
5.0	4.30	3.92	3.67	3.53	0.77
6.0	5.56	5.25	4.93	4.73	0.83
7.0	6.91	6.73	6.53	6.34	0.57

2.3.2 灭菌温度对 pH 的影响 观察不同灭菌温度(30 min)对成品 pH 值得影响。调节中间品 pH 值为 6.0, 纯化水为溶剂, 灭菌时间 30 min 灭菌温度分别为 100, 105, 110 °C。灭菌完毕后, 40 °C/75% RH 条件下加速试验 3 个月, 观察 pH 值的变化情况, 结果显示, 随着灭菌温度的升高, 产品 pH 下降幅度增加, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Tab. 2 Results of sample determination

灭菌温度/°C	0 月	1 月	2 月	3 月	差值(D)
100	5.63	5.40	5.29	5.01	0.62
105	5.49	5.10	4.79	4.48	1.01
110	5.21	4.54	4.05	3.67	1.54

2.3.3 不同水质对 pH 的影响 观察不同水质作溶剂对成品 pH 值的影响。分别用自来水、纯化水和注射用水作溶剂, 中间品 pH 值调节至 6.0, 灭菌条件为 100 °C/30 min。灭菌完毕后, 在 40 °C/75% RH 条件下放置 3 个月, 观察 pH 值的变化, 结果显示, 不同水质制备的产品, 灭菌后的 pH 下降幅度差异明显。尤其是自来水对产品 pH 的影响最大。结果见表 3。

表 3 样品测定结果

Tab. 3 Results of sample determination

溶剂	0 月	1 月	2 月	3 月	差值(D)
自来水	5.17	4.75	4.48	4.25	0.92
纯化水	5.57	5.40	5.24	5.11	0.46
注射用水	5.64	5.53	5.41	5.32	0.32

2.4 工艺条件的正交优化试验

本研究采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方案, 3 个因素分别为灭菌前中间品溶液的 pH 值(A), 灭菌温度(30 min)(B), 溶液中多价金属阳离子浓度(C)。以放置 1 个月(温度 25 °C, 相对湿度 60%条件下)后测定 pH 值的变化为考察指标。灭菌前中间品的 pH 值通过氢氧化钠稀溶液调节; 通过向溶液中加入 0.01%量的 Mg^{2+} 来增加溶液离子浓度或向溶液中加入 0.01%量的 EDTA-2Na 来消除溶液中的金属离子的影响。每个因素选取 3 个水平(见表 4),

以 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 结果见表 4。产品放置 1 个月(温度 25 °C, 60% RH 条件下), 测定 pH 值。正交试验安排及结构处理见表 5。

表 4 正交试验因素与水平

Tab. 4 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A	B/°C	C
1	5	100	0
2	6	105	0.01% EDTA-2Na
3	7	110	0.01% Mg^{2+}

表 5 正交试验安排与结果分析

Tab. 5 Orthogonal test arrangement and result analysis

试验号	A	B	C	酸碱度
1	1	1	1	4.40
2	1	2	2	4.65
3	1	3	3	4.05
4	2	1	2	5.50
5	2	2	3	5.42
6	2	3	1	5.20
7	3	1	3	6.63
8	3	2	1	6.80
9	3	3	2	6.58
K_1	13.10	16.53	16.40	
K_2	16.12	16.87	16.73	CT=269.29
K_3	20.01	15.83	16.10	
\bar{k}_1	4.37	5.51	5.47	
\bar{k}_2	5.37	5.62	5.58	
\bar{k}_3	6.67	5.28	5.37	
R	2.30	0.34	0.21	

正交试验结果显示, 3 个因素的极差大小顺序为 $A>B>C$, 即中间品溶液 pH 对产品稳定性的影响最大, 灭菌温度的影响其次, 而水质对产品稳定性的影响最小, 但也值得注意。同时, 得出稳定性最佳的工艺条件组合为 $A_3B_2C_2$, 即中间品 pH 7.0、105 °C/30 min 灭菌并加 0.01% EDTA-2Na。

2.5 稳定性考察

选用稳定性最佳组合 $A_3B_2C_2$, 即中间品 pH 7.0、105 °C/30 min 灭菌并加 0.01% EDTA-2Na, 配制 3 批产品, 批号分别为 130510, 130511, 130512, 每批 100 支, 进行稳定性考察, 观察产品 pH 值、利巴韦林含量、溶液色泽的变化情况。

2.5.1 加速试验 将 3 批样品于 40 °C, 75% RH 条件下放置 6 个月, 分别于 0, 1, 2, 3, 6 个月后取样, 进行检测。结果见表 6。

2.5.2 长期试验 将 3 批样品于 25 °C, 60% RH 条件下放置 6 个月, 分别于 0, 1, 2, 3, 6 个月后取样, 进行各项测定。结果见表 7。

表 6 加速试验结果

Tab. 6 Results of accelerated test

观察内容	0月	1月	2月	3月	6月	差值(D)
酸碱度	6.95	6.68	6.51	6.42	6.37	0.58
利巴韦林含量/%	100.3	99.8	99.0	98.4	97.9	2.4
溶液色泽	微黄	微黄	微黄	微黄	黄	-

表 7 长期试验结果

Tab. 7 Results of long term test

观察内容	0月	1月	2月	3月	6月	差值(D)
酸碱度	6.95	6.84	6.76	6.70	6.68	0.27
利巴韦林含量/%	100.3	100.0	99.7	99.5	99.0	1.3
溶液色泽	微黄	微黄	微黄	微黄	微黄	-

根据以上两项试验数据来看,产品在存放 6 个月后的 pH 值分别下降了 0.58 和 0.27,利巴韦林含量分别下降 2.4%和 1.3%。

3 讨论

通过对产品质量稳定性各主要因素及影响路径的分析和试验,确定了中间品溶液 pH、灭菌温度和金属离子为最可能影响产品质量稳定性的 3 个因素,从而采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行工艺条件的优化。结果显示,因素 A、B、C 的 R 值分别为 2.30, 0.34, 0.21, 即因素 $A>B>C$, 证明中间品溶液的 pH 值对灭菌后产品在 25 °C/60% RH 条件下放置 1 个月后产品的 pH 值变化的影响最大,灭菌温度对其 pH 值的影响其次,而金属离子的存在对其 pH 值的影响相对最小,但也不容忽视。优选最

佳工艺条件为中间品 pH 值 7.0, 105 °C/30 min 灭菌并用 EDTA-2Na 处理。由此制得的产品,经过 6 个月的加速试验(40 °C, 75% RH)和长期试验(25 °C, 60% RH),产品的 pH 值、利巴韦林含量以及溶液色泽均较稳定,较好地提升了该产品的工艺水平和质量稳定性。

根据以上研究结果,综合考虑制备过程中的实际情况,确定复方利巴韦林口服液工艺条件为中间品的 pH 值 6.9~7.0, 105 °C/30 min 灭菌,纯化水为溶剂,并用 EDTA-2Na 对接触药液的容器具进行严格处理。以此为该产品的优选工艺条件,所得产品质量稳定可靠,较目前市售产品的稳定性有显著提升。

REFERENCES

- [1] 浙江省医疗制剂规范(2005)[S]. 2005: 253.
- [2] 赵云强. 蔗糖转化速率常数与酸度和温度的关系[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2000, 18(4): 84-86.
- [3] CHENG R Z, GAO H W, WANG X J. The mechanism study of acid catalyzed sucrose hydrolysis reaction [J]. J Changchun Teach Coll(长春师范学院学报), 1999, 18(5): 19-21.
- [4] ZHANG J, LI Y P, WANG B Y. Sucrase catalyzed hydrolysis of sucrose [J]. J Luoyang Teach Coll(洛阳师范学院学报), 2011, 30(2): 54-56.
- [5] ZHOU K. The study of saccharides hydrolysis to levulinic acid [D]. Jiangsu: Jiangnan Normal University, 2008.
- [6] 顾学裘. 药物制剂注解[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 181.
- [7] 中国药典. 第二部[S]. 2010: 1207, 附录 15.

收稿日期: 2014-07-01

HPLC 同时测定补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的含量

陈为飞¹, 李渊贞², 朱希², 王玲², 尹华^{2*} (1.浙江司太立制药股份有限公司, 浙江 仙居 317300; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 采用 HPLC 波长切换法, 建立同时测定补肾活血颗粒中松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛 3 成分含量的分析方法。方法 采用 Zorbax Extend-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷、桂皮醛的检测波长分别为 227, 210, 290 nm; 进行样品前处理工艺和方法学考察。结果 松脂醇二葡萄糖苷、苦杏仁苷和桂皮醛均得到很好分离, 浓度分别在 0.426 0~2.88 6 μg·mL⁻¹, 7.455~86.60 μg·mL⁻¹ 和 0.440 6~13.22 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r \geq 0.999$); 平均加样回收率分别为 98.3%(RSD=1.6%), 101.4%(RSD=1.1%)和 100.0%(RSD=1.2%); 精密度假试验峰面积 RSD 均 ≤ 1.4%。结论 该方法预处理简单, 方法灵敏、准确、重复性好, 可用于补肾活血颗粒及相关制剂的质量控制。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81273772); 浙江省中医药科学研究基金项目(2010ZA026); 浙江省中药现代化项目(浙经信[2010]421 号)

作者简介: 陈为飞, 男, 工程师 Tel: (0576)87718649 E-mail: Cwf1166@163.com *通信作者: 尹华, 女, 教授, 博导 Tel: (0571)86613604 E-mail: maryyinhua@163.com