

甘露聚糖肽滴鼻液的制备及其质量控制

金伟华^{1*}, 陈 华¹, 张 明¹, 蒲志强¹, 钟 妙²(1.成都军区总医院药剂科, 成都 610083; 2.泸州医学院药理学系, 四川 泸州 646000)

中图分类号 R943;R987 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0828-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.21

摘要 目的:制备甘露聚糖肽滴鼻液,并对其进行质量控制。方法:以水为溶媒、氯化钠为渗透压调节剂、甘露聚糖肽为主药,制备甘露聚糖肽滴鼻液。将甘露聚糖肽滴鼻液酸性水解、碱性衍生后,采用高效液相色谱法测定其中甘露糖的含量。流动相为乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液(20:80),检测波长为250 nm。结果:所制备的样品为淡黄色澄明液体,pH及其他检查均符合《中国药典》要求,规格为10 mg/ml,甘露糖检测质量浓度的线性范围为21.4~107 μg/ml($r=0.999\ 9$),低、中、高质量浓度样品的回收率分别为98.64%、97.08%、98.36%,RSD为1.02%、1.32%、0.69%($n=3$)。结论:甘露聚糖肽滴鼻液的制备方法可行、质量可控。

关键词 甘露聚糖肽;滴鼻液;制备;水解;衍生化;高效液相色谱法;质量控制

Preparation and Quality Control of Mannatide Nasal Drops

JIN Wei-hua¹, CHEN Hua¹, ZHANG Ming¹, PU Zhi-qiang¹, ZHONG Miao²(1.Dept. of Pharmacy, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, China; 2.Dept. of Pharmacy, Luzhou Medical College, Sichuan Luzhou 646000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Mannatide nasal drops and carry out quality control of it. METHODS: With water as solvent, sodium chloride as osmotic pressure regulator, mannatide was made into nasal drops. After acidic hydrolysis and basic derivatization, the content of mannose was determined by HPLC with mobile phase consisted of acetonitrile-0.02 mol/L ammonium acetate solution (20:80) at the detection wavelength of 250 nm. RESULTS: Prepared sample was faint yellow transparent liquid, and pH and other examination terms of the samples were all in line with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*, with specifications of 10 mg/ml. The linear range of mannose was 21.4-107 μg/ml ($r=0.999\ 9$); average recoveries were 98.64%, 97.08% and 98.36% at low, medium and high concentrations, respectively (RSD were 1.02%, 1.32%, 0.69%, $n=3$). CONCLUSIONS: The method is feasible and controllable in quality for Mannatide nasal drops.

KEYWORDS Mannatide; Nasal drops; Preparation; Hydrolysis; Derivatization; HPLC; Quality control

甘露聚糖肽是从健康人口腔分离的 α -溶血性链球菌菌株经深层培养、发酵提取而得到的一种具有免疫活性和抗肿瘤作用的糖肽类物质,其具有明显增强人体免疫功能及抗肿瘤的作用。临床上用于免疫功能低下、反复呼吸道感染、白细胞减少、再生障碍性贫血及肿瘤的辅助治疗。目前,甘露聚糖肽已开发的剂型有片剂、口服液、胶囊剂、注射液,但尚无对甘露聚糖肽滴鼻液的研究。为此,我们研制了甘露聚糖肽滴鼻液。该制剂用于改善免疫功能低下以及免疫功能低下所致的反复呼吸道感染、肝炎、肝硬化的抗病毒治疗等。将甘露聚糖肽制成滴鼻液可避免肝脏首关效应,提高药物的生物利用度。甘露聚糖肽是具有免疫活性的糖肽类物质,目前关于复杂体系中单糖检测尚缺少普适的高效液相色谱(HPLC)检测方法,专用糖柱(配体交换分离)价格昂贵、易损耗且样品前处理繁琐^[1]。多数制药企业及药物研发机构主要采用紫外-可见分光光度计控制甘露聚糖肽制剂的质量。1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(PMP)是一种具有强紫外吸收的衍生试剂,该试剂可

与还原性糖在温和条件下反应,产物无立体异构体且在紫外245 nm波长处有强烈的吸收。因此,本研究将甘露聚糖肽水解为甘露糖,采用PMP对甘露糖进行柱前衍生,建立了甘露聚糖肽滴鼻液中甘露糖的柱前衍生化HPLC法,得到了令人满意的结果。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国安捷伦公司);AL204型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司,精度:0.000 1 g];HH-S24S数显恒温水浴锅(上海君竺仪器制造有限公司);101-2A型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甘露聚糖肽原料药(成都利尔药业有限公司,批号:130301,药用级);*d*-甘露糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140651-200602,供含量测定用);PMP(成都市科龙化工试剂厂,批号:20120801,纯度: $\geq 99.0\%$);氯化钠(江苏省勤奋药业有限公司,批号:20130129,药用级);灭菌注射用水(四川科伦药业股份有限公司,批号:A130402L);水为三重蒸馏水。

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:028-86570424。E-mail:jwh311@sina.com

2 处方与制备

2.1 处方

甘露聚糖肽 10.0 g, 氯化钠 6.0 g, 加注射用水至 1 000 ml。

2.2 制备

称取处方量甘露聚糖肽、氯化钠, 加注射用水适量搅拌溶解后, 再加注射用水至全量, 搅拌均匀, 加入 0.1% 注射用活性炭, 加热煮沸 15 min, 趁热脱炭, 无菌过滤, 测定含量、pH 等; 合格后灌封于 5 ml 滴鼻液瓶中, 进行澄明度、外观色泽、含量、有关物质等检查, 即得甘露聚糖肽滴鼻液, 设立批号为: 20130415、20130419、20130422。

3 质量控制

3.1 性状

本品应为淡黄色澄明液体。

3.2 pH

量取本品 50 ml, 依据 2010 年版《中国药典》(二部) 附录 VI H 项下 pH 测定法进行测定^[2], 本品 pH 应为 5.5~7.0。

3.3 其他

其他各项(鉴别、装量、微生物限度)检查均应符合 2010 年版《中国药典》(二部) 附录 I R 项下鼻用制剂要求^[2]。

3.4 含量测定

3.4.1 色谱条件。色谱柱: Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液 (20:80), 流速: 1 ml/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。

3.4.2 甘露糖对照品贮备液的制备。精密称取 *D*-甘露糖对照品 0.010 7 g, 置于 100 ml 量瓶中, 加水适量使溶解, 用水定容至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 107 μg/ml 的对照品贮备液。

3.4.3 对照品溶液的制备。精密量取 *D*-甘露糖对照品贮备液 20、15、10、5 ml, 分别置于 25 ml 量瓶中, 用水定容至刻度, 制备成质量浓度分别为 85.6、64.2、42.8、21.4 μg/ml 的对照品溶液。

3.4.4 供试品溶液的制备。精密量取甘露聚糖肽滴鼻液 2 ml, 置于 100 ml 量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀; 精密量取稀释液 2 ml, 置于顶空瓶中, 加入 3.0 mol/L 的盐酸溶液 2 ml, 抽真空, 封口, 混匀, 110 °C 水解 2 h, 冷却后, 用 3.0 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 即得。

3.4.5 空白溶液的制备。精密量取 2 ml 水, 置于顶空瓶中, 按“3.4.4”项下方法操作制备成不含甘露聚糖肽的空白溶液。

3.4.6 系统适用性试验。取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各 0.8 ml, 分别加 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液与 0.3 mol/L 的氢氧化钠溶液^[3]各 0.8 ml, 混匀, 70 °C 水浴反应 100 min。冷却后加 0.3 mol/L 的盐酸溶液 0.9 ml, 用三氯甲烷洗涤 3 次, 每次 2 ml, 弃去三氯甲烷液, 水层过滤后, 定容至 3 ml。分别精密吸取上清液各 10 μl, 照“3.4.1”项下色谱条件注入色谱仪, 记录色谱。结果表明, 空白溶液对甘露糖的测定无干扰, 待测峰分离度良好, 理论板数按甘露糖峰计算不低于 5 000, 分离度大于 1.5。HPLC 色谱图见图 1。

3.4.7 线性关系考察。取“3.4.2”“3.4.3”项下 107、85.6、64.2、42.8、21.4 μg/ml 的对照品溶液, 按“3.4.6”项下方法衍生处理后, 进样测定, 记录色谱。以对照品质量浓度(*x*)为横坐标、峰面积(*y*)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 157\ 25x - 12.440$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明, 甘露糖检测质量浓度的线性范围为 21.4~107 μg/ml。

3.4.8 精密度试验。取质量浓度为 107 μg/ml 的对照品溶液,

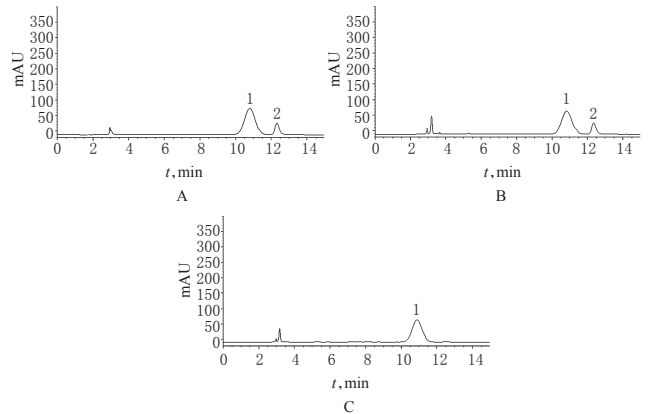


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白溶液; 1. PMP; 2. 甘露糖衍生物
Fig 1 HPLC chromatograms
A. control solution; B. test sample solution; C. blank solution; 1. PMP; 2. mannose derivative

按“3.4.6”项下方法衍生处理后, 进样测定, 连续进样 6 次, 记录色谱, 计算峰面积的 RSD=1.87% ($n=6$), 表明此方法的精密程度符合要求。

3.4.9 重复性试验。分别量取同一批样品 6 份, 按“3.4.4”“3.4.6”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理, 进样测定, 记录色谱, 计算峰面积的 RSD=1.31% ($n=6$), 表明此方法的重复性良好。

3.4.10 稳定性试验。取样品 1 份, 按“3.4.4”“3.4.6”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理, 分别于 0、1、2、4、6、24 h 内进样测定, 记录色谱, 计算峰面积的 RSD=1.03% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.4.11 回收率试验。取已知含量的样品, 精密加入甘露糖对照品溶液适量 (42.8、64.2、85.6 μg/ml), 制备成低、中、高 3 种质量浓度的溶液, 按“3.4.4”“3.4.6”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理, 进样测定, 记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=3$)

已知量, μg/ml	加入量, μg/ml	测得总量, μg/ml	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
41.5	42.8	83.30	97.66	98.64	1.02
		84.16	99.67		
		83.70	98.60		
41.5	64.2	103.50	96.57	97.08	1.32
		104.76	98.54		
		103.22	96.14		
41.5	85.6	125.76	98.43	98.36	0.69
		125.08	97.64		
		126.24	99.00		

3.4.12 样品测定。取样品 3 批, 按“3.4.4”“3.4.6”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理, 进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算含量, 本品含甘露聚糖肽以甘露糖计算, 结果见表 2。

4 讨论

4.1 甘露聚糖肽的水解

由于甘露聚糖肽完全由不同链长的甘露聚糖肽分子构成, 不存在单糖、双糖等小分子糖类, 因此首先应水解甘露聚糖肽得到甘露糖。多糖的水解常采用盐酸、硫酸、三氟乙酸。

正交设计法优化布洛芬缓释骨架片的处方工艺

祝侠丽*, 贾永艳, 黄海英, 杜艳龙(河南中医学院药学院, 郑州 450008)

中图分类号 R944.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0830-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.22

摘要 目的:制备布洛芬缓释骨架片并筛选其最佳工艺条件。方法:以累积释放百分率为考察指标,以羟丙甲纤维素(HPMC)、微晶纤维素(MCC)处方中用量及片剂的硬度等为考察因素,采用正交试验设计 $L_9(3^4)$ 进行处方和工艺优化。结果:优化布洛芬缓释骨架片处方工艺中HPMC、MCC处方中用量分别为12.5%、3.0%,片剂硬度为80 N;制备的3批布洛芬缓释骨架片可持续释放24 h,具有明显的缓释效果,其释放符合Higuchi方程($r>0.980 0$)。结论:优化的工艺可行,可延长布洛芬的释药时间。

关键词 布洛芬;缓释骨架片;处方;工艺;正交试验设计

Optimization of Formulation and Preparation Process of Ibuprofen Sustained-release Matrix Tablets by Orthogonal Design

ZHU Xia-li, JIA Yong-yan, HUANG Hai-ying, DU Yan-long (Pharmacy College, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Ibuprofen sustained-release matrix tablets and optimize the formulation of it. METHODS: Taking accumulative release percent as index, the formulation and preparation process were optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment design using the amount of HPMC and MCC, hardness of the tablets as factors. RESULTS: The optimum formulation and preparation process of Ibuprofen sustained-release tablets were as follows: the amounts of HPMC and MCC were 12.5% and 3.0%; the hardness of tablets was 80 N. 3 batches of Ibuprofen sustained-release tablets were released for consecutive 24 h and showed obvious sustained-release behavior; it was in line with Higuchi equation ($r>0.980 0$). CONCLUSIONS: Optimized technology is feasible and can prolong drug-release time of ibuprofen.

KEYWORDS Ibuprofen; Sustained-release matrix tablets; Formulation; Preparation process; Orthogonal design

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Content determination of samples ($n=3$)

样品批号	占标示量百分含量, %	RSD, %
20130415	91.75	0.85
	90.83	
	90.21	
20130419	93.42	0.83
	92.78	
	91.89	
20130422	95.33	0.63
	94.27	
	94.32	

经过试验,并权衡各种溶剂的优缺点,本研究最终采用3.0 mol/L的盐酸溶液作为水解溶媒。

4.2 甘露糖的衍生化^[4]

由于甘露糖没有紫外吸收基团,不能用于紫外检测,因此本文采用PMP化学衍生法使甘露糖带上紫外吸收基团。PMP作为衍生化试剂,可以在温和的水浴条件下与糖链进行定量反应;且HPLC法检测甘露糖衍生物,灵敏度较高,重现性好。

4.3 pH的控制

本文的主要思路是“酸水解、碱衍生”。甘露聚糖肽在酸性条件下(pH应控制在2~5)水解,水解后应调节pH至中性;

* 讲师,硕士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0371-65962746。E-mail:zhuxiali1980@126.com

甘露糖衍生时,应保证是在碱性条件下(pH应控制在9~12)进行的。如果pH控制不好,试验很容易导致色谱图中甘露糖衍生物无检测信号。

4.4 PMP的萃取

甘露糖衍生反应结束后,在油/水两相分离时,应充分混合溶剂,由于甘露糖衍生物太少,为了检测甘露糖衍生物必须使三氯甲烷萃取过量的PMP。目前实验室现有条件,利用三氯甲烷萃取PMP已得到较好效果,虽仍然残留部分PMP,但PMP剩余峰并不干扰目标峰的测定。

参考文献

- [1] 王立东,张丽萍.利用木聚糖酶酶解小麦麸皮制备低聚木糖工艺参数的研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(1):61.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录17、18、44.
- [3] 章乐建,泮玉华,赵颖飞.高效液相色谱法测定乐清栽培的铁皮石斛不同年份甘露糖的含量[J].海峡药学,2012,24(3):79.
- [4] 郝桂堂,陈尚卫,朱松,等.对氨基苯甲酸衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖及糖醛酸组成[J].色谱,2007,25(1):75.

(收稿日期:2013-05-13 修回日期:2013-11-04)