

甘草酸二铵注射液的研制

张伟明¹, 李健和^{2*}, 黎银波³, 曹俊华²

(1. 湖南省妇幼保健院药剂科, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011;
3. 湖南省药品检验所, 长沙 410001)

[摘要] 目的: 制备甘草酸二铵注射液, 建立其质量控制方法, 并考察其稳定性和安全性。方法: 优化处方组成与制备工艺, 采用紫外分光光度法测定甘草酸二铵的含量, 采用高效液相色谱法测定有关物质, 进行常规注射剂检查。结果: 甘草酸二铵检测浓度在 24.96 ~ 58.24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好 ($r=0.9999$), 其平均回收率为 99.1%, RSD 0.34%。加速试验 6 月和长期留样试验 12 月, 稳定性良好。结论: 制备工艺简便可行, 质量可控, 稳定性良好。

[关键词] 甘草酸二铵注射液; 质量控制; 稳定性; 安全性

[中图分类号] R 283.6, R 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0035-04

甘草酸二铵 (diammonium glycyrrhizinate) 是中药甘草有效成分的第三代提取物, 具有较强的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用, 适用于伴有谷丙转氨酶升高的急、慢性病毒性肝炎的治疗^[1-4]。现将甘草酸二铵注射液的制备、质量控制、稳定性、安全性研究的结果报告如下。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪; SPD-10Avp 紫外检测器; 分析之星色谱工作站; 北京瑞利分析仪器公司 UV-1200 型紫外分光光度计; 上海精密科学仪器有限公司 FA1004N 型电子分析天平; 上海雷磁仪器厂 pH-3C 型精密酸度计; 天津大学精密仪器厂 GWJ-3 智能微粒检测仪; 天津大学精密仪器厂 YB-Z 型澄明度检测仪; 杭州高得医疗器械有限公司全封闭式 HTY-2000 型集菌仪; 杭州高得医疗器械有限公司 KSF 集菌培养器; 广东医疗器械厂生化培养箱。

甘草酸二铵原料药 (西安富捷生物技术发展公司提供, 批号 20080204, 质量分数 97.8%); 氯化钠 (江苏勤奋制药厂, 批号 20071223, 质量分数 99.90%); 甘草酸二铵注射液 (中南大学湘雅二医院药学部和衡阳恒生制药有限公司研制提供; 规格 10 mL: 50 mg; 批号 20081224, 20081225, 20081226); 对

照品烟酰胺 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 10115-0001, 质量分数 99.8%)。乙腈色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 处方工艺优化

在确定本研制的甘草酸二铵注射液规格为 10 mL: 50 mg 的基础上, 对本品的处方工艺进行优化。

2.1 考察活性炭对甘草酸二铵的吸附 称取甘草酸二铵 12.5 g 和氯化钠 20.0 g, 加入热注射用水 (60 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$) 约 2 300 mL 中, 不断搅拌使溶后, 用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液适量调 pH 至 7.0, 补加注射用水至 2 500 mL, 然后等分成 5 份, 每份 500 mL, 分别加入适量药用炭, 装入 500 mL 玻璃输液瓶中, 封口, 加热煮沸 15 min 后, 抽滤脱炭, 精滤后, 灌封于 10 mL 安瓿中, 115 $^{\circ}\text{C}$ 热压灭菌 30 min。以活性炭对甘草酸二铵的吸附以及采用家兔法检查制剂热原等为指标进行考察, 考察结果见表 1。

表 1 活性炭吸附试验考察

活性炭用量/%	外观性状	pH	标示含量/%	热原反应
0	无色澄明液体	7.01	100.2	+
0.03	无色澄明液体	6.99	98.9	-
0.05	无色澄明液体	6.98	96.8	-
0.10	无色澄明液体	6.96	95.5	-
0.20	无色澄明液体	6.93	94.2	-

根据实验结果, 本工艺中确定活性炭去除热原的条件为: 加入配液总量 0.05% 的药用炭, 加热煮沸 15 min。鉴于活性炭对原料药有一定的吸附, 生产时应根据原料药含量适当增加投药量, 大约 4%。

2.2 灭菌条件的选择 按上述优选工艺制成每支

[收稿日期] 20100114(006)

[通讯作者] * 李健和, 副主任药师, 硕士。研究方向: 新药研究开发, Tel: 0731-85292093, E-mail: lijianhexy@126.com

10 mL 注射剂,其中取 50 支不灭菌,剩余的样品等分成 3 份,其中一份于 121 °C 热压灭菌 20 min,一份于 115 °C 热压灭菌 30 min,一份于 100 °C 流通蒸气灭菌 45 min,即得。结果表明:药物制备过程中无异常现象产生,在上述 3 种不同的灭菌条件下,制剂室温放置和冰箱中冷藏(0~5 °C)1 个月均未见有结晶析出,甘草酸二铵注射液灭菌前后外观性状、pH 值、有关物质、含量等均基本上无明显变化,表明本品对热稳定性良好,为确保灭菌彻底和临床用药安全,故其灭菌条件选择为:115 °C 热压灭菌 30 min。见表 2。

表 2 甘草酸二铵注射液在同一 pH 不同灭菌条件下的质量考察结果

考察项目	121 °C 灭菌 20 min		115 °C 灭菌 30 min		100 °C 灭菌 45 min	
	灭菌前	灭菌后	灭菌前	灭菌后	灭菌前	灭菌后
pH	7.04	7.02	7.04	7.02	7.04	7.03
有关物质 /%	4.94	5.03	4.94	4.97	4.94	4.97
主药含量 /%	100.4	100.2	100.4	100.1	100.4	100.3

2.3 确定药液 pH 范围 称取 10.0 g 甘草酸二铵和 16.0 g 氯化钠各 6 份,分别加入热注射用水

表 3 甘草酸二铵注射液在不同 pH 同一灭菌条件下的质量考察结果

考察项目	灭菌		灭菌		灭菌		灭菌		灭菌	
	前	后	前	后	前	后	前	后	前	后
pH	6.01	6.00	6.52	6.53	7.00	7.00	7.54	7.52	8.02	8.01
有关物质 /%	4.91	4.91	4.83	4.80	4.84	4.87	4.87	4.94	4.93	4.94
主药含量 /%	99.8	99.6	100.0	100.1	100.2	100.0	99.8	99.8	100.3	100.1

3.1.3 取含量测定项下的溶液,照分光光度法(《中国药典》2005 年版二部附录 VI A)测定,在 252 nm 的波长处有最大吸收。

3.2 有关物质检查 照高效液相色谱法(《中国药典》2005 年版二部附录 V D)测定。

3.2.1 色谱条件与系统适应性试验 Hypersil ODS2 分析柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水-冰醋酸(76:20:4);检测波长 252 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL;理论板数按甘草酸二铵峰计算应不低于 3 000。

3.2.2 溶液的配制 精密量取本品 5 mL,置 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取上述供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。按处方配制制成 100 mL 不含甘草酸二铵的空白辅料溶液,备用。然后精密量取上述溶液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液。

(60~80 °C)约 1 800 mL 中,不断搅拌使溶后,用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液适量分别调节药液 pH 至 6.0,6.5,7.0,7.5,8.0,同法制成每支 10 mL 注射剂,115 °C 热压灭菌 30 min。考察结果表明:药液 pH 在 6.0~8.0,灭菌前后外观性状、pH、有关物质、含量等基本上无明显变化,室温放置和冰箱中冷藏(0~5 °C)1 个月内均未见有结晶析出,生产中一般可控制 pH 在 7.0 左右。见表 3。

3 质量控制

3.1 鉴别

3.1.1 取本品 60 mL,加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 6 mL,煮沸 10 min,放冷,滤过,滤液备用。取沉淀用水洗涤至洗液呈中性,105 °C 干燥 1 h,加乙醇 10 mL 使溶解,取乙醇液 1 mL,加 10% 2,6-二叔丁基对苯甲酚乙醇溶液 0.5 mL 和 20% 氢氧化钠溶液 1 mL,置水浴上加热 30 min,液面应出现紫红色悬浮物。

3.1.2 取鉴别 3.1.1 项下的滤液 5 mL,加间萘二酚 10 mL 和盐酸 5 滴,煮沸 1 min,放冷,加苯 3 mL,振摇,苯层应即显紫红色。

3.2.3 空白干扰试验 取上述空白辅料溶液 20 μL,照上述色谱条件操作进样,结果表明空白辅料对检测无干扰。

3.2.4 最低检出限 精密量取上述供试品溶液适量,加流动相逐级稀释测定,当 S/N ≈ 3,样品浓度为 0.25 μg·mL⁻¹,进样 20 μL,最低检出量为 5 ng。

3.2.5 破坏性试验 ①酸破坏性试验:取甘草酸二铵注射液 5 mL,加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL,加热回流 40 min,取出,放冷,用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调至中性。②碱破坏性试验:取甘草酸二铵注射液 5 mL,加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL,加热回流 40 min,取出,放冷,用 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调至中性。③氧化破坏性试验:取甘草酸二铵注射液 5 mL,加 30% 的 H₂O₂ 溶液 10 mL,室温放置 4 h。④热破坏性试验:取甘草酸二铵注射液 5 mL,加流动相 20 mL,加热回流 2 h,放冷。⑤光破坏性试验:取甘草酸二铵注射液 5 mL,加流动相 20 mL,光照

(5 000 Lx)72 h。以上各样品,用流动相稀释至 50 mL,摇匀,取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图。试验结果表明:在上述色谱条件下,甘草酸二铵注射液经酸、碱、氧化、热、光照破坏后所产生的杂质峰均能与主峰达到有效分离,说明在该色谱条件下能有效地测定本品有关物质。

测定方法 取对照溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高度为满量程的 10% ~ 25%;再量取供试溶液和对照溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍,供试品溶液的色谱图中如显杂质峰,量取各杂质峰面积的和与对照溶液主峰面积比较(1.0%),3 批样品的有关物质测定结果分别为 4.95%,4.97% 和 5.01%,其单一杂质峰面积均小于对照溶液主峰面积的 4.0 倍;各杂质峰面积的总和均小于对照溶液主峰面积的 10.0 倍(忽略不计小于对照溶液主峰面积 10.0% 的色谱峰),3 批样品的有关物质检查均在合格范围内。

3.3 含量测定 在参考相关文献资料^[5-8]的基础上,以烟酰胺为对照品,采用紫外分光光度法对甘草酸二铵注射液的含量测定进行研究。

3.3.1 测定波长的选择 取烟酰胺对照品适量,加水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 20 μ g 的溶液,取甘草酸二铵原料药及甘草酸二铵注射液空白辅料溶液适量,分别加水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 40 μ g 的溶液,在 200 ~ 600 nm 内进行紫外扫描测定,结果表明烟酰胺对照品在(261 \pm 2)nm 的波长处有最大吸收,故选择 261 nm 作为烟酰胺的测定波长。甘草酸二铵在(252 \pm 2)nm 的波长处有最大吸收,选择 252 nm 作为甘草酸二铵的测定波长。阴性样品在测定波长处没有吸收,不干扰样品测定。

3.3.2 线性试验 对照品烟酰胺的线性试验 精密称取经 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的烟酰胺对照品适量(0.051 2 g),置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备溶液;然后从上述贮备溶液中分别精密量取 2,3,4,5,6 mL 置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;以水为空白,取上述系列浓度溶液分别于 261 nm 的波长处测定吸收度。以吸收度(A_1)为横坐标,浓度(C_1)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为: $A_1 = 0.0257C_1 - 0.0004$, $r_1 = 0.9999$ 。结果表明烟酰胺在 10.24 ~ 30.72 μ g \cdot mL⁻¹内,吸收度与浓度的线性关系良好。

甘草酸二铵的线性试验 精密称取经 80 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重的甘草酸二铵原料药适量(0.041 6 g),置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为贮备溶液;然后从上述贮备溶液中分别精密量取 3,4,5,6,7 mL 置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;以水为空白,取上述系列浓度溶液分别于 252 nm 的波长处测定吸收度。以吸收度(A_2)为横坐标,浓度(C_2)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为: $A_2 = 0.0138C_2 + 0.0079$, $r_2 = 0.9999$ 。结果表明甘草酸二铵浓度在 24.96 ~ 58.24 μ g \cdot mL⁻¹,吸收度与浓度的线性关系良好。

3.3.3 稳定性试验 取 20.48 μ g \cdot mL⁻¹ 烟酰胺对照品溶液,以水为空白,分别于 0,2,4,6,8,12 h 在 261 nm 的波长处测定吸收度,结果在 12 h 内的平均吸收度为 0.542,RSD 0.42%,对照品溶液在 12 h 内的吸收度基本稳定。取甘草酸二铵注射液供试品溶液,以水为空白,分别于 0,2,4,6,8,12 h 在 252 nm 的波长处测定吸收度,结果供试品溶液在 12 h 内的平均吸收度为 0.500,RSD 0.28%,供试品溶液的吸收度在 12 h 内基本稳定。

3.3.4 回收率试验 精密称取经 80 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重的甘草酸二铵原料药适量(低 16 mg、中 20 mg、高 24 mg 各 3 份),共 9 份,分别置 50 mL 量瓶中,模拟甘草酸二铵注射液的处方配制样品溶液,加水溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取上述溶液各 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,照分光光度法(《中国药典》2005 年版二部附录 IV A),在 252 nm 的波长处测定吸收度;另取经 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的烟酰胺对照品约 50 mg,精密称定,加水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 20 μ g 的溶液,作为对照品溶液,在 261 nm 的波长处测定吸收度,代入公式:甘草酸二铵% = $[(2A_{\text{样}}/1.105A_{\text{对}})/(W_{\text{对}}/W_{\text{样}})] \times 100\%$,计算甘草酸二铵的回收率以及相对标准偏差。结果其平均回收率为 99.1%,RSD 0.34%,其回收率良好。

3.3.5 精密度试验 对照品烟酰胺溶液精密度试验 取同一份对照品溶液,以水为空白,在 261 nm 的波长处连续测定 6 次,记录吸收度。结果对照品烟酰胺溶液的平均吸收度为 0.534,RSD 0.20%。取同一份供试品溶液,以水为空白,在 252 nm 的波长处连续测定 6 次,记录吸收度。结果供试品溶液的平均吸收度为 0.541,RSD 0.36%,该方法的精密

度良好。

3.3.6 样品含量测定 精密量取本品适量,加水稀释制成每 1 mL 中约含 40 μg 的溶液,照分光光度法(《中国药典》2005 年版二部附录 IV A),在 252 nm 的波长处测定吸收度;另取经 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的烟酰胺对照品适量,精密称定,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 20 μg 的溶液,在 261 nm 的波长处测定吸收度,计算其含量。3 批甘草酸二铵注射液的标示百分含量分别为 100.9%, 100.1%, 101.5%, 均在 90.0% ~ 110.0%。

3.3.7 重复性试验 取同一批样品(批号 20081225),共 6 份,按含量测定项下方法,分别测定其含量,结果其平均标示含量为 100.2%, RSD 为 0.21%, 重复性良好。

4 稳定性考察

按药典中药物稳定性的有关规定,进行常规影响因素、加速及长期稳定性试验,结果光照、高温及低温条件下 5 d, 10 d 稳定;加速试验条件下放置 6 个月稳定;室温条件下放置 12 个月较为稳定。本品有效期暂定为 1 年,贮存条件为:遮光、密闭保存。

5 安全性试验

按药典注射剂常规要求,对甘草酸二铵注射液进行了全身过敏性、溶血性及血管刺激性试验,以此评价本品用药的安全性。结果甘草酸二铵注射液无过敏反应;溶血试验为阴性;未见明显的刺激性。

6 讨论

活性炭对甘草酸二铵有明显的吸附作用,并且随着活性炭用量的增加而加大。这是由于甘草酸二铵是大分子化合物(相对分子质量为 857.01),而且含极性基团(—COOH, —OH 等)较多,易被吸附,因此,活性炭用量宜适当,投料时宜适当增大投料量。

成品的澄明度随着 pH 的升高而升高,但当 pH > 7.5 时,却出现成品率下降,这可能与活性炭在

碱性条件下出现“胶溶”或脱吸附作用,反使溶液中的杂质增加有关。

在参考相关文献^[5-11]的基础上,采用高效液相色谱法测定有关物质,采用紫外分光光度法测定甘草酸二铵的含量,其含量测定的方法学研究结果表明:采用该方法测定本品含量空白溶液不干扰样品测定,线性试验、回收率试验、精密度试验、稳定性试验、重复性试验等均满足检测要求,其操作简便、重现性好,能够控制本品质量。

[参考文献]

- [1] 赵蓉, 吕凌. 甘草酸二铵药理研究和临床应用进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(3): 31.
- [2] 杨丽蓉, 徐晓玉. 甘利欣的药理作用与临床应用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2003, 3(3): 191.
- [3] 叶爱菊. 甘草酸铵临床应用进展[J]. 中草药, 1999, 3(4): 275.
- [4] 吴锡铭. 甘利欣——一种新型抗肝炎剂的研究[J]. 现代应用药学, 1995, 12(4): 52.
- [5] 甘草酸二铵国家药品标准[S] WS1-(X-460)-2003Z.
- [6] 甘草酸二铵注射液国家药品标准[S] WS1-(X-407)-2003Z.
- [7] 赖瑛, 王佩. 3 种紫外分光光度法测定甘草酸二铵含量的比较[J]. 中国药业, 2004, 13(12): 46.
- [8] 江冬梅. 紫外分光光度法测定甘草酸二铵含量[J]. 医院传染病药学杂志, 1997, 7(4): 9.
- [9] 方红英, 吕坚, 吴锡铭. β 环糊精对甘草酸二铵胶囊体外溶出度和体内生物利用度的影响[J]. 现代应用药学, 1995, 12(3): 56.
- [10] 罗奕. HPLC 法测定甘利欣注射液中有关注物质的含量[J]. 中医药导报, 2008, 14(6): 105.
- [11] 梁振福, 王培娜. 甘草酸二铵注射液有效期的测定[J]. 河南大学学报: 医学版, 2006, 25(3): 35.

[责任编辑 仝燕]