

基于吸收系数的生脉注射液中聚山梨酯 80 含量测定新方法

聂黎行, 常艳, 戴忠, 马双成*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要 聚山梨酯 80 又名吐温 80, 为一种亲水型非离子表面活性剂, 是食品、保健品和药品中常用的辅料, 作为增溶剂和澄清剂广泛用于中药注射剂。近年来, 不良反应的发生使得聚山梨酯 80 的质量和和应用愈加受到重视, 有研究认为其加入可能引起注射剂不良反应增加。为避免超量使用, 有必要对该辅料的投料加以严格控制。中药注射剂中聚山梨酯 80 的含量测定是当下研究的热点和难点, 可以通过分光光度法、分子排阻-蒸发光散射检测法 (SEC-ELSD)、液质联用法 (LC-MS) 直接测定, 也可以水解后法经液相色谱-紫外检测法 (HPLC-UV) 或气相色谱法 (GC) 间接测定。但由于聚山梨酯 80 为聚氧乙烯聚合数目不同的混合物、不同厂家生产的聚山梨酯 80 化学组分及比例存在较大差异, 难以采用统一的转换公式或对对照品准确定量。此外, 中药注射剂的复杂基质造成的假阳性干扰也对定量提出了挑战。为解决以上问题, 以生脉注射液为例, 提出基于吸收系数的中药注射剂中聚山梨酯 80 含量测定新方法。优化检测波长、显色剂种类、液液萃取过程振荡和静置时间, 在 6 个不同品牌仪器上测得聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物的吸收系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 为 104.23, 相对标准偏差 (RSD) 为 2.08%。生脉注射液稀释 10 倍后, 精密量取供试品溶液 1.0 mL, 精密加入硫氰酸钴溶液 10 mL, 二氯甲烷 20 mL, 涡旋振荡 3 min。将混合液移至分液漏斗中, 静置 30 min, 取下层二氯甲烷液, 将前 1 mL 弃去, 接收约 15 mL, 在 320 nm 处测定吸光度, 再根据 Lambert-Beer 定律, 利用获得的吸收系数计算得到聚山梨酯 80 的含量。方法阴性无干扰, 精密度和重复性相对标准偏差均低于 3%, 平均回收率为 98.42%。为进一步验证方法的准确性, 分别采用吸收系数法和标准曲线法测定了 2 个厂家的 10 批生脉注射液, 并与实际投料量比较。配对 t 检验结果表明, 当置信度为 95% 时, 两种方法无显著性差异, 吸收系数法测得结果与企业生产中聚山梨酯的实际投料量也无显著性差异。研究采用前人未采用的、灵敏度更高的 320 nm 为检测波长, 显著降低了基质干扰, 克服了中药注射剂中聚山梨酯 80 测定结果与实际投料量难以吻合的问题。吸收系数法无需使用对照品, 亦不用制备标准曲线, 可为中药注射剂中聚山梨酯 80 的检查标准提供切实可行的解决方案。所建方法灵敏、准确、快速、简便, 为含聚山梨酯 80 制剂的质量控制提供了关键常数及新的思路。

关键词 聚山梨酯 80; 生脉注射液; 吸收系数; 硫氰酸钴; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)01-0199-05

引言

聚山梨酯 80 (polysorbate 80) 又名吐温 80 (tween-80), 作为增溶剂、乳化剂、稳定剂或润滑剂用于药品制剂过程^[1-5], 为提高透明度和稳定性, 其在中药注射剂中的应用尤为广泛。有研究认为聚山梨酯 80 的加入可能引起注射剂不良反应增加^[6-7], 郭志鑫等^[8]发现多个中药注射剂存在超量使用

聚山梨酯 80 的现象, 因此有必要对该辅料的投料加以严格控制。

聚山梨酯 80 由油酸、失水山梨醇、环氧乙烷经酯化、聚合生成, 中国药典定义其系油酸山梨坦与环氧乙烷聚合而成的聚氧乙烯 20 油酸山梨坦。实际上 1 mol 油酸山梨坦与 20 mol 聚氧乙烯的合成只是总投料比, 具体到每一个分子上聚合的聚氧乙烯数目并不相同, 所以聚山梨酯 80 是一个聚氧乙烯聚合数目不同的混合物。另一方面, 由于原料来源、生

收稿日期: 2017-12-25, 修订日期: 2018-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81303194), 国家中医药管理局“中药标准化建设”项目 (ZYBZH-C-JS-32), 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金项目 (2017X1) 资助

作者简介: 聂黎行, 1982 年生, 中国食品药品检定研究院副研究员 e-mail: nielixing@163.com

* 通讯联系人 e-mail: masc@nifdc.org.cn

生产工艺的不同,使得不同厂家产品的化学组分及比例存在较大差异^[9]。以上现实情况对其质量控制提出了挑战。

中药注射剂中聚山梨酯 80 的含量测定是当下研究的热点和难点,按测定方式可分为间接测定法和直接测定法两种。间接法包括高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱法(GC)。HPLC 法^[10]基于反相色谱测定聚山梨酯 80 的水解产物油酸,精密度较高,但因油酸不稳定性而受到限制。GC 法^[11]将聚山梨酯 80 水解成油酸后酯化,得到更加稳定的油酸甲酯用于测定,但前处理步骤的增加为准确度和精密度带来了不利影响。上述两种方法都是通过油酸或者油酸甲酯与聚山梨酯 80 分子量之比折算含量,但聚山梨酯 80 分子量只是一个理论值,所以间接法难以准确定量。直接法包括 SEC-ELSD(分子排阻-蒸发光散射)法和分光光度法。SEC-ELSD 法^[12]前处理简单,但聚山梨酯 80 色谱行为复杂,并非单一色谱峰,给准确定量带来困难。此外,SEC-ELSD 法定量的基本前提在于所用对照品与样品中聚山梨酯 80 的化学组成必须完全一致,但不同来源的聚山梨酯 80 的化学组成和比例存在很大差异,其在 ELSD 上的响应也不尽相同。在建立质量标准时,由于不同企业辅料来源不同,因此难以找到统一对照品用于定量。聚山梨酯 80 的紫外光谱仅有末端吸收,但其结构中的聚乙氧基可以和硫氰酸钴反应形成蓝色复合物,经有机溶剂萃取后可在 620 nm 左右采用分光光度法测定含量^[13]。中药注射剂基质复杂,某些成分自身或者与硫氰酸钴反应后在测定波长处可能也有吸收,造成本底偏高,出现假阳性结果。即便可以通过扣除不含聚山梨酯 80 的阴性样品的吸收消除系统误差,但如要制订质量标准,很难同时提供统一的阴性样品用于检验。

本研究提出一种中药注射剂中聚山梨酯 80 含量测定新方法,利用聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物在 320 nm 的百分吸收系数对生脉注射液进行定量。该方法灵敏、准确、快速、简便,无需对照品,为中药注射剂等含聚山梨酯 80 制剂的质量控制提供了关键常数及新的思路。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

E240 电子天平(瑞士 Mettler 公司); 8453 紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司); EVOLUTION 260 BIO 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司); UV-2401PC 紫外-可见分光光度计(日本 SHIMADZU 公司); Lambda 35 紫外-可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司); U-3900 紫外-可见分光光度计(日本 HITACHI 公司); TU-1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); Milli-Q 型超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

聚山梨酯 80 对照品(批号 R030X0,含量以 100%计,美国药典会); 硫氰酸铵、硝酸钴、三氯化铁、氯化钠、二氯甲烷、三氯甲烷(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为超纯水。生脉注射液及相应的缺聚山梨酯 80 的阴性对照品分别由 A、B 两个药厂提供。

1.2 溶液制备

1.2.1 对照品溶液

取聚山梨酯 80 对照品,精密称定,加水分别制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液。

1.2.2 供试品溶液

精密量取生脉注射液 1 mL,于 5 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。

1.2.3 阴性对照溶液

取缺聚山梨酯 80 的阴性对照,按“1.2.2”项操作,配制。

1.3 吸收系数的测定

精密量取对照品溶液 0.8, 1.0 和 1.2 mL 至锥形瓶中,精密加水补足至 2.0 mL,精密加入硫氰酸钴溶液(称取硝酸钴 6.0 g、硫氰酸铵 40.0 g,加水溶解并稀释至 200 mL)10 mL,二氯甲烷 20 mL,涡旋振荡 3 min。将混合液移至分液漏斗中,静置 30 min,取下层二氯甲烷液,前 1 mL 弃去,接收约 15 mL,随行制备空白溶液。在 320 nm 处,采用紫外-可见分光光度法(中国药典 2015 年版四部通则 0401),分别在 6 个不同品牌、型号仪器上测定吸光度。共测得 54 个数据,求平均值,得到聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物的百分吸收系数为 104.23, RSD 为 2.08%,见表 1。

表 1 聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物
320 nm 下的吸收系数

Table 1 Absorption coefficient of cobalt thiocyanate complex of polysorbate 80, detected at 320 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$, $n=3$)

紫外-可见光谱仪 品牌和型号	聚山梨酯 80 对照品浓度 /(mg · mL ⁻¹)	吸收 系数
Agilent 8453	0.04	101.90
	0.05	104.76
	0.06	109.35
Thermo EVOLUTION 260 BIO	0.04	104.485
	0.05	105.84
	0.06	110.21
SHIMADZU UV-2401PC	0.04	102.01
	0.05	104.57
	0.06	106.96
PerkinElmer Lambda 35	0.04	99.18
	0.05	100.17
	0.06	103.55
HITACHI U-3900	0.04	103.62
	0.05	100.07
	0.06	103.46
PERSEE TU-1901	0.04	103.11
	0.05	104.87
	0.06	108.16

1.4 标准曲线的制备

分别精密量取对照品溶液 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.4 mL,按“1.3”项操作,记录吸光度。以浓度为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y,绘制标准曲线,并进行线性回归,求得回归方程: $y=0.552 2x-0.031 2$, $r=0.999 8$ 。

1.5 样品测定

精密量取供试品溶液 1.0 mL, 按“1.3”项操作, 记录吸光度。采用吸收系数法计算聚山梨酯 80 含量: 由 Lambert-Beer 定律可得 $c=A/\epsilon b$, 其中 A 为吸光度, b 为比色皿光程 1 cm, ϵ 为“1.3”项求得的聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物在 320 nm 的吸收系数。为验证吸收系数法的准确性, 将吸光度带入“1.4”项求得的回归方程, 采用标准曲线计算聚山梨酯 80 含量。

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择

聚山梨酯 80 与硫氰酸钴反应后形成蓝色复合物, 现行方法均采用 620 nm 左右的可见区波长测定含量, 但中药注射剂基质复杂, 某些化学成分本身或其与硫氰酸钴的反应产物可能干扰测定, 造成吸光度偏高。本研究对上述推测进行了验证, 取两个药厂提供的生脉注射液样品和缺聚山梨酯

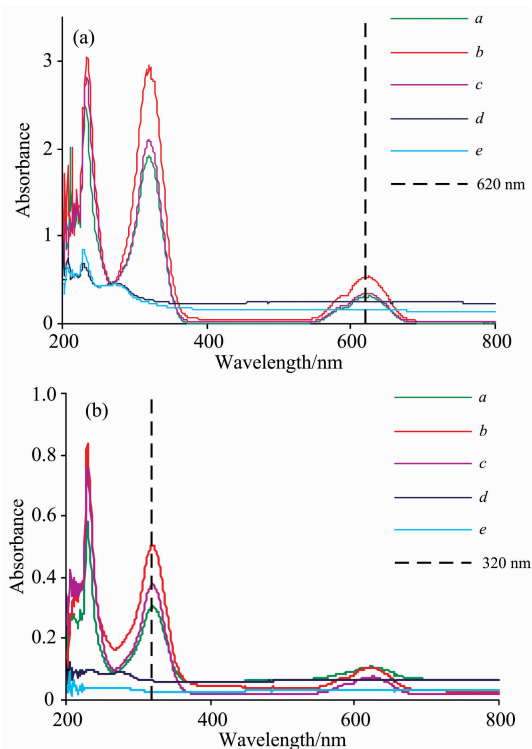


图 1 聚山梨酯 80 对照品(a), A 厂家生脉注射液(b), B 厂家生脉注射液(c), A 厂家缺聚山梨酯 80 阴性对照(d), B 厂家缺聚山梨酯 80 阴性对照(e)紫外-可见光谱图, 720 nm(1)和 320 nm(2)下测定

Fig. 1 Ultraviolet-visible spectra of polysorbate 80 reference standard (a), Shengmai Injection from manufacturer A (b) Shengmai Injection from manufacturer B (c), negative sample without polysorbate 80 from manufacturer A (d) and negative sample without polysorbate 80 from manufacturer A (e), detected at 620 nm (1) and 320 nm (2) respectively

80 阴性对照各 1 mL, 分别按“1.3”项操作, 在 620 nm 测定吸光度。结果显示 A 和 B 两个药厂的生脉注射液吸光度分别为 0.532 0 和 0.342 9, 相应阴性对照吸光度分别为 0.246 4 和 0.156 8, 干扰严重, 见图 1(a)。转而在前人研究并未选取的聚山梨酯 80-硫氰酸钴配合物的最大吸收 320 nm 处测定, 由于显色灵敏度大幅度提高, 样品需稀释 10 倍后再显色, 结果该波长下 A 和 B 两个药厂的生脉注射液吸光度分别为 0.504 6 和 0.377 5, 相应阴性对照吸光度分别为 0.062 2 和 0.028 5, 干扰显著降低[见图 1(b)]。

2.2 显色剂的选择

考察了另一种显色剂硫氰酸铁(称取三氯化铁 2.7 g、硫氰酸铵 3.0 g, 加水溶解并稀释至 200 mL)的效果。聚山梨酯 80 与硫氰酸铁反应形成紫红色复合物, 在 518 nm 有一最大吸收。该体系灵敏度最高, 空白干扰小, 但稳定性考察结果表明随着静置分层时间延长, 二氯甲烷层溶液吸光度持续降低, 故最终选用了灵敏度适中、稳定性好的硫氰酸钴显色。

2.3 显色条件的优化

对显色时间、分层时间进行了优化, 结果表明振荡 20 min(补足重量)、10 min(补重)与振荡 3 min, 测得吸光度基本一致, 说明振荡 3 min 显色完全; 分液漏斗静置 15, 30, 60, 120 和 240 min, 吸收值在 30 min 达到稳定。经比较后发现, 先将下层二氯甲烷液的一小部分冲洗分液漏斗颈部, 接收中部溶液, 比直接接取所有下层液的操作, 重复性显著提高。由于二氯甲烷易挥发, 实验过程应注意控制温度。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性

取两个厂家的缺聚山梨酯 80 阴性对照溶液, 按“1.3”项操作, 于 320 nm 测定吸光度, 均低于 0.07, 说明生脉注射液中的红参、麦冬、五味子提取液对测定基本无干扰[见图 1(b)]。

2.4.2 精密度

取生脉注射液(批号 17021003), 制备供试品溶液, 按“1.3”项操作, 连续测定 6 次吸光度, RSD 值为 1.93%。

2.4.3 重复性

取同一批生脉注射液(批号 17021003), 平行制备 6 份供试品溶液, 按“1.3”项操作, 记录吸光度, 吸收系数法计算得平均含量为 $3.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 值为 2.21%。

2.4.4 回收率

精密量取已知含量的生脉注射液(批号 17021319)0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入聚山梨酯 80 对照品溶液 4 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 按“1.3”项操作, 平行制备 6 份溶液, 记录吸光度, 吸收系数法计算含量, 平均回收率为 98.42%, RSD 值为 3.64%, 见表 2。

2.5 样品测定结果

2 个厂家的 10 批生脉注射液, 分别采用吸收系数法和标准曲线法求得聚山梨酯 80 的含量, 结果见表 3。配对 t 检验结果表明, 当置信度为 95% 时, 两种方法无显著性差异, 吸收系数法测得结果与企业生产中聚山梨酯的实际投料量也无显著性差异。

表 2 生脉注射液中聚山梨酯 80 对照品加标回收实验
Table 2 Recovery of polysorbate 80 reference standard in spiked Shengmai Injection sample

含有量 /mg	加入量 /mg	吸光度	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.388	0.404	0.408 0	0.769	94.37		
0.388	0.404	0.414 6	0.782	97.45		
0.388	0.404	0.407 8	0.769	94.26	98.42	3.64
0.388	0.404	0.422 9	0.797	101.34		
0.388	0.404	0.421 7	0.795	100.77		
0.388	0.404	0.425 1	0.801	102.34		

3 结 论

基于吸收系数建立了生脉注射液中聚山梨酯 80 含量测定的新方法,结果准确可靠,操作简便快速,无需绘制标准曲线,无需对照品,可为中药注射剂中聚山梨酯 80 的检测提供有效解决方案。方法选用灵敏度更高的 320 nm 为检测波长,阴性干扰显著降低,克服了中药注射剂中聚山梨酯 80 测定结果与实际投料量难以吻合的问题。采用该方法对参附、

参麦、野菊花注射液等其他品种进行了考察,聚山梨酯 80 测得量与相应样品实际投料量接近,但因目前缺乏阴性对照,专属性还有待确证。拟进一步扩大样品范围,建立中药注射剂中聚山梨酯 80 含量测定的通用方法。

表 3 生脉注射液中聚山梨酯含量测定结果

Table 3 Contents of polysorbate 80 in Shengmai Injection (n=3)

厂家	批号	吸收系数法	标准曲线法	实际投料
		测得含量/ (mg · mL ⁻¹)	测得含量/ (mg · mL ⁻¹)	含量/ (mg · mL ⁻¹)
A	17021003	3.8	3.9	4.0
A	17021101	4.0	3.9	4.0
A	17021318	4.0	3.9	4.0
A	17021319	4.0	3.9	4.0
A	17021401	3.9	4.0	4.0
B	16010302005	3.1	3.2	3.0
B	16030202005	3.0	3.2	3.0
B	16070101001	3.1	3.2	3.0
B	16080301007	3.1	3.3	3.0
B	16080402006	3.1	3.3	3.0

References

- [1] Singh S R, Zhang J, O'Dell C, et al. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 2012, 13(2): 422.
- [2] Zdravkovic S A. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 93: 475.
- [3] Yusuf M, Khan M, Khan R A, et al. *Journal of Microencapsulation*, 2016, 33(7): 646.
- [4] Serno T, Härtl E, Besheer A, et al. *Pharmaceutical Research*, 2013, 30(1): 117.
- [5] Tian X H, Lin X N, Wei F, et al. *International Journal of Nanomedicine*, 2011, 6: 445.
- [6] ZHANG Rui, WANG Yu, GAO Zheng-song, et al(张 锐, 王 玉, 高正松, 等). *Chinese Pharmaceutical Journal(中国药学杂志)*, 2015, 50(10): 876.
- [7] WU Ren-rong, PENG Wen-yong, TU Jia-sheng(吴仁荣, 彭文勇, 涂家生). *Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology(药物生物技术)*, 2016, 23(1): 39.
- [8] GUO Zhi-xin, SUN Hui-min, YANG Rui, et al(郭志鑫, 孙会敏, 杨 锐, 等). *Journal of Pharmaceutical Practice(药学实践杂志)*, 2012, 30(6): 459.
- [9] LI Zhen-hu, WANG Hua-long, LIU Yan-ting, et al(李振虎, 王化龙, 刘艳庭, 等). *Chinese Journal of New Drugs(中国新药杂志)*, 2016, 25(23): 2664.
- [10] Hvattuma E, Yip W L, Grace D, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2012, 62(2): 7.
- [11] HUANG Yun-zhong, YANG Bin, YE Chi-ming, et al(黄运中, 杨 彬, 叶驰名, 等). *Chinese Journal of Biologicals(中国生物制品学杂志)*, 2016, 29(2): 201.
- [12] SHEN Juan, ZHANG Qiao, LI Jia-chun, et al(沈 娟, 张 桥, 李家春, 等). *China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志)*, 2014, 39(15): 2915.
- [13] WU Chun-li, LI Ai-xing, LI Jie-ming, et al(吴春丽, 李爱星, 李捷明, 等). *China Pharmacy(中国药房)*, 2012, 23(40): 3823.

A New Method for Determination of Polysorbate 80 in Shengmai Injection Based on Absorption Coefficient

NIE Li-xing, CHANG Yan, DAI Zhong, MA Shuang-cheng*

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract Polysorbate 80, also known as Tween 80, is an amphipathic non-ionic surfactant commonly used as excipient in the food, personal care and pharmaceutical industries. Particularly, it has been widely used in Traditional Chinese Medicine (TCM) injections to enhance solubility and clarity. In recent years, more attentions have been paid to the quality and application of polysorbate 80 due to incidence of adverse reactions. Some declared that adding of polysorbate 80 might increase the side effects. To avoid abuse of this excipient, it is essential to control the levels of polysorbate 80 in therapeutic formulations within a target level. Assay of polysorbate 80 in TCM injections has become a hot and difficult issue nowadays. Content of polysorbate 80 in preparations could be quantified directly by spectrophotometry, size-exclusion chromatography coupled with evaporative light scattering detector (SEC-ELSD) or liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS) method. Acid hydrolysis followed by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detector (HPLC-UV) or gas chromatography (GC) determination was also used as an indirect measurement of polysorbate 80. But it's hard to find a unified conversion formula or reference standard for accurate quantification owing to the fact that the surfactant is a complex mixtures of oligomers, whose composition and ratio of chemical components vary by different manufacturers. In addition, it becomes a challenge to measure polysorbate 80 in TCM injections without false-positive interference due to the complex matrix of the preparation. Taking Shengmai Injection as example, a novel method for determination of polysorbate 80 in TCM injections was proposed based on absorption coefficient, which offered a solution for the above problems. After optimization of detection wavelength, chromogenic reagent and of the shaking and standing time of the liquid-liquid extraction, absorption coefficient ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) of cobalt thiocyanate complex of polysorbate 80 was obtained from 6 different bands of instruments as 104.23 with RSD of 2.08%. Shengmai Injection was first diluted by 10 times. To 1.0 mL of the test solution, 10 and 20 mL of dichloromethane were added accurately to form a polysorbate/thiocyanate complex, followed by cyclotron oscillation for 3 minutes. The mixture was transferred into a separating funnel and was stranded for 30 minutes. The first 1 mL of the lower layer was discarded and the next 15 mL was collected. Then the absorbance was measured at 320 nm. Finally the content of polysorbate 80 was calculated by using the previously obtained absorption coefficient based on Lambert-Beer law. With no interference from the negative sample, the established method provided precision and reproducibility (% relative standard deviation) less than 3% and accuracy (% spike recovery) of 98.42%. To further validate the accuracy of the method, 10 batches of Shengmai Injection from 2 manufacturers were determined by both the absorption coefficient method and the standard curve method, and the results were compared with the actual feeding content of polysorbate 80 in the sample. Results of paired *t* test indicated that there were no significance difference between the results obtained by two methods, or between the results of the absorption coefficient method and the actual feeding content of polysorbate 80 ($p > 0.05$). The investigation selected 320 nm as the detection wavelength to improve the sensitivity, which was never adopted in previous work. In this way, remarkable decrease of matrix interference was achieved, thus the problem of misfit determination results and the actual feeding content of polysorbate 80 was solved. With no need for reference standard or standard curve, the search offered a feasible tool for test standard of polysorbate 80 in TCM injection. All in all, the proposed method was sensitive, accurate, rapid and simple, which can provide key constants and new ideas for quality control of preparations containing polysorbate 80.

Keywords Polysorbate 80; Shengmai injection; Absorption coefficient; Cobalt thiocyanate; Quantification

(Received Dec. 25, 2017; accepted Mar. 29, 2018)

* Corresponding author