

复方庚酸炔诺酮注射液中苯甲醛含量与茶油酸值、过氧化值的相关性研究^Δ

彭茗*,任飞亮,朱瀛华,杨永健(上海市食品药品检验所,上海 201203)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1171-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.07

摘要 目的:建立复方庚酸炔诺酮注射液(CNEI)中苯甲醛含量的测定方法,并探讨苯甲醛含量与辅料茶油酸值、过氧化值的相关性。方法:采用2010年版《中国药典》(一部)附录IX酸值、过氧化值的方法,测定市售2008年和2010年生产的各2批CNEI的酸值和过氧化值;采用气相色谱法测定其中苯甲醛的含量(以CNEI中所含苯甲醇的量计),分析苯甲醛含量与茶油酸值、过氧化值的相关性。结果:2008年生产的2批CNEI样品的酸值(0.614 4、0.621 3)和过氧化值(0.135 4%、0.103 9%)均明显高于2010年生产的2批样品的酸值(0.361 7、0.393 0)和过氧化值(0.051 3%、0.092 9%)。4批CNEI中苯甲醛含量分别为4.08%、4.08%、0.31%、0.45%,苯甲醛的含量与CNEI酸值及过氧化值的Spearman相关系数均为0.949,单侧P值均为0.026。结论:随贮存时间的延长,CNEI的过氧化值及酸值均有所增加;CNEI中苯甲醛的含量与茶油的酸值和过氧化值均呈显著的正相关。

关键词 复方庚酸炔诺酮注射液;茶油;酸值;过氧化值;苯甲醛;含量

Correlation of Benzaldehyde Content with Acid Value of Tea-seed Oil and Peroxide Value in Compound Norethisterone Enanthate Injection

PENG Ming, REN Fei-liang, ZHU Ying-hua, YANG Yong-jian (Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of benzaldehyde in Compound norethisterone enanthate injection (CNEI), and to investigate the relationship of benzaldehyde content with acid value of tea-seed oil and peroxide value. METHODS: According to the method stated in the appendix IX of volume I of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), the acid value and peroxide value of 2 batches of CNEI produced in 2008 and 2010 were determined. The content of benzaldehyde was determined by GC (by benzaldehyde content of CNEI), and the correlation of benzaldehyde with acid value of tea-seed oil and peroxide value was analyzed. RESULTS: The acid value (0.614 4, 0.621 3) and peroxide value (0.135 4%, 0.103 9%) of 2 batches of samples manufactured in 2008 were all higher than the corresponding results in the samples manufactured in 2010 (0.361 7, 0.393 0), (0.051 3%, 0.092 9%). The contents of benzaldehyde in 4 batches of CNEI were 4.08%, 4.08%, 0.31% and 0.45%. Spearman's rank correlation coefficients between the amount of benzaldehyde and the acid value as well as the peroxide value were both 0.949, and the one-side P values were both 0.026. CONCLUSIONS: The acid value and peroxide value of CNEI increase with the extension of storage life. The amount of benzaldehyde is positively correlated with acid value of tea-seed oil and peroxide value in CNEI.

KEY WORDS Compound norethisterone enanthate injection; Tea-seed oil; Acid value; Peroxide value; Benzaldehyde; Content

- Blood*, 2004, 103(12): 4 554.
- [6] Mallela J, Yang Z, Shariat-Madar Z. Prolylcarboxypeptidase: a cardioprotective enzyme[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(3): 477.
- [7] Tamaoki J, Sugimoto F, Tagaya E, et al. Angiotensin II 1 receptor-mediated contraction of pulmonary artery and its modulation by prolylcarboxypeptidase[J]. *J Appl Physiol*, 1994, 76(4): 1 439.
- [8] Qin XP, Ye F, Liao DF, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the depressor effects of losartan and perindopril in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 464(1): 63.
- [9] Campbell DJ, Krum H, Esler MD. Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans[J]. *Circulation*, 2005, 111(3): 315.
- [10] 杨晓青,李最琼,曾泗宇,等.吴茱萸次碱对高血压大鼠胸主动脉血管肽酶C表达的影响研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(15): 1 124.
- [11] Qin XP, Zeng SY, Li D, et al. Calcitonin gene-related peptide-mediated depressor effect and inhibiting vascular hypertrophy of rutaecarpine in renovascular hypertensive rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(6): 654.
- [12] 肖云彬,田海红,陈碧,等.氯沙坦对肾性高血压大鼠心肌组织血管紧张素转换酶2表达的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2010, 18(1): 71.
- [13] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation and fibrosis[J]. *Hypertension*, 2001, 38(3 Pt 2): 581.
- [14] Zhao Y, Qiu Q, Mahdi F, et al. Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(4): H1 821.

(收稿日期:2012-06-25 修回日期:2012-09-18)

Δ基金项目:2011年国家药品评价抽验任务资助项目(No.2011-125)

*主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:021-38839900-26313。E-mail:ming0519@hotmail.com

复方庚酸炔诺酮注射液(Compound norethisterone enanthate injection, CNEI)为庚酸炔诺酮和戊酸雌二醇的灭菌油溶液,肌肉注射后可逐步释药而发挥长效避孕作用,规格为每1 ml中含庚酸炔诺酮50 mg、戊酸雌二醇5 mg。本注射液的主要辅料为茶油,体积分数占辅料总量的58%(V/V),因此茶油的质量对本品的质量至关重要。茶油为山茶科植物油茶*Camellia oleifera* Abel或小叶油茶*Camellia meiocarpa* Hu ms.的成熟种子用压榨法得到的脂肪油,收载于2010年版《中国药典》(一部)^[1]。笔者曾参照2010年版《中国药典》(二部)^[2]所收载的大豆油中脂肪酸组成的分析方法,对CNEI中的辅料茶油采用气相色谱-质谱(GC-MS)法进行定性检测,结果证明其主要化学成分为油酸、棕榈酸、亚油酸和硬脂酸;再采用气相色谱-氢火焰离子化检测器(GC-FID)法进行定量测定,结果油酸、棕榈酸、亚油酸和硬脂酸分别约占茶油质量的72%~75%、8.0%~8.3%、6.8%~7.8%和1.9%~2.1%(m/m),4种脂肪酸总和占茶油质量的90%(m/m)以上,与文献^[3]报道基本一致。由于茶油中含大量的不饱和脂肪酸,而注射用油在生产过程中又要经过高温灭菌的过程,因此容易发生酸败,生成游离脂肪酸、过氧化物和低分子醛类(如苯甲醛)、酮类等有毒物质^[4]。酸值和过氧化值是测定酸败度的重要指标,本文对4批不同批号的CNEI进行测定,结果表明CNEI中苯甲醛的含量分别与其酸值和过氧化值呈显著性正相关。

1 材料

BP211D电子分析天平(德国Sartorius股份有限公司,精度:0.01 mg);OriginPro 8统计软件(美国Origin Lab公司);6890型气相色谱仪(美国Agilent公司);DB-WAX型毛细管色谱柱(美国J&W公司)。

CNEI(批号:080502、080503、100701、100901,规格:每1 ml中含庚酸炔诺酮50 mg、戊酸雌二醇5 mg)、庚酸炔诺酮原料药(批号:100103)、戊酸雌二醇原料药(批号:090307)和辅料苯甲醇(批号:11398-10-09-01)、茶油(批号:11313-11-05-11)、苯甲酸苄酯(批号:11441-10-03-1)均由浙江仙琚制药股份有限公司提供,均为分析纯,除茶油外,各原、辅料的纯度均在99.0%以上;碘化钾、乙醚、三氯甲烷和冰醋酸均为分析纯;苯甲醛和*N,N*-二甲基乙酰胺(DMA)均为色谱纯;氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)和硫代硫酸钠滴定液(0.1 mol/L)均为上海市食品药品检验所标化。

2 方法

2.1 酸值测定方法

参照2010年版《中国药典》(一部)附录IX N的酸值测定方法进行测定。取CNEI样品约5 g,精密称定,置于250 ml锥形瓶中,加中性乙醇-乙醚(1:1)50 ml,振荡使完全溶解,用氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)滴定,至粉红色持续30 s不褪色。另分别取处方量的原、辅料,同法测定。按照以下公式计算酸值:供试品的酸值= $A \times 5.61/m$ 。式中,*A*:消耗氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)的容积(ml);*m*:供试品的质量(g)。

2.2 过氧化值测定方法

参照2010年版《中国药典》(一部)附录IX P的过氧化值测定方法。取CNEI样品约5 g,精密称定,置于250 ml干燥碘瓶中,加三氯甲烷-冰醋酸(1:1)混合溶液30 ml,使溶解。精密加新制碘化钾饱和溶液1 ml,密塞,轻轻振摇0.5 min,在暗处放置3 min,加水100 ml,用硫代硫酸钠滴定液(0.1 mol/L)滴定至溶液呈浅黄色,加淀粉指示液1 ml,继续滴定至蓝色消失;同时做空白试验。另分别取处方量的原、辅料,同法测定。按照以

下公式计算过氧化值:供试品的过氧化值= $[(A-B) \times 0.001269/m] \times 100\%$ 。式中,*A*:消耗的硫代硫酸钠滴定液(0.1 mol/L)的容积(ml);*B*:空白试验消耗的容积(ml);*m*:供试品的质量(g)。

2.3 苯甲醛测定方法

取CNEI 0.25~2.5 g(视样品中苯甲醛含量调整取样量),精密称定,置于10 ml量瓶中,加DMA溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液。精密称取苯甲醛对照品适量,加DMA定量稀释制成每1 ml中分别含0.005、0.01、0.025、0.05、0.1 mg的溶液,作为对照品溶液(1)~(5)。照气相色谱法,用DB-WAX型毛细管色谱柱,进样口温度为200 ℃,分流比为10:1,FID检测器温度为300 ℃,柱压保持在5.0 psi,初始柱温为50 ℃,以10 ℃/min的升温速率升至220 ℃,保持35 min。分别精密量取供试品溶液和对照品溶液(1)~(5)各1 μl,分别注入气相色谱仪,记录色谱图。按标准曲线法以峰面积计算,即得。

3 结果与分析

3.1 酸值

4批CNEI的酸值测定结果见表1。

表1 4批CNEI的酸值和过氧化值测定结果

Tab 1 Acid values and peroxide values of 4 batches of CNEI

批号	酸值	过氧化值, %
080502	0.614 4	0.135 4
080503	0.621 3	0.103 9
100701	0.361 7	0.051 3
100901	0.393 0	0.092 9

CNEI的辅料包括茶油、苯甲醇和苯甲酸苄酯,其中茶油收载于2010年版《中国药典》(一部),酸值限度为3;苯甲醇收载于2010年版《中国药典》(二部),酸值限度为0.3;苯甲酸苄酯未被《中国药典》收载,且在各国药典中均无酸值的检查项,因此可忽略不计。另根据2个主药的酸值滴定结果,发现其对酸值均无贡献。根据2010年版《中国药典》,酸值系指中和脂肪、脂肪油或其他类似物质1 g中含有的游离脂肪酸所需氢氧化钾的质量(mg),因此可以将各辅料占处方总质量的比例作为权重系数,分别乘以各辅料相应的酸值限度,计算出综合酸值的限度。由于茶油和苯甲醇分别占处方总质量的50%(m/m)和2%(m/m),则得出综合酸值限度应为 $3 \times 50\% + 0.3 \times 2\% \approx 1.50$ 。可见,4批样品的酸值均未超出限度,但2008年生产的样品的酸值约为2010年生产的样品的1.5~1.7倍,证明本品随着贮存时间的延长,有游离脂肪酸形成。

3.2 过氧化值

4批CNEI的过氧化值测定结果见表1。

2010年版《中国药典》(一部)中的过氧化值系指油脂中过氧化物与碘化钾作用生成游离碘的百分数。2010年版《中国药典》(二部)中过氧化值系指每1 000 g供试品中含有的其氧化能力与一定量的氧相当的过氧化物量,测定步骤与一部略有不同,但基本原理一致。其计算公式与一部有所不同,计算公式为(式中*A*、*B*和*m*的含义均同“2.2”项下):供试品的过氧化值= $(A-B) \times 10/m$ 。

该计算方法在国家标准GB/T 5538-1995《油脂过氧化值》中也有所采用。为使前后统一、便于比较,在本文中均将过氧化值换算为2010年版《中国药典》(一部)的计算公式。在2010年版《中国药典》(二部)中,苯甲醇的过氧化值限度为5。若参照2010年版《中国药典》(一部)的公式换算,苯甲醇的过氧化值限度应为0.063 45%。

2010年版《中国药典》(一部)的茶油各论中无过氧化值检

查项,因此无合适的限度。由于《中国药典》收录的茶油为压榨法得到的,可参考国家标准GB 11765-2003《油茶籽油》对压榨成品油茶籽油的规定:一级品过氧化值 $\leq 6.0\%$,酸值 ≤ 1.0 ;二级品过氧化值 $\leq 7.5\%$,酸值 ≤ 2.5 。可见,食用压榨茶油的酸值要求均要严于《中国药典》的药用茶油,而食用茶油二级品的酸值限度与药用茶油比较接近。因此,笔者采用食用压榨茶油二级品的过氧化值限度,即7.5%作为药用辅料茶油的过氧化值限度。由于GB 11765-2003中《油茶籽油》的过氧化值计算公式与2010年版《中国药典》(二部)一致,故以2010年版《中国药典》(一部)的公式换算,限值应为0.095 18%。

经对方量的原辅料分别进行滴定试验,发现苯甲酸苄酯和戊酸雌二醇对过氧化值结果均无贡献,而庚酸炔诺酮对过氧化值的结果有一定的贡献,将滴定结果根据“2.2”项下计算公式计算,得到庚酸炔诺酮的过氧化值滴定结果为0.255 0%。由于4批CNEI中庚酸炔诺酮的含量差异不大,且通过破坏试验后的高效液相色谱法含量测定结果得知,在正常的贮存条件下,庚酸炔诺酮稳定性较好,可以假定庚酸炔诺酮在贮存周期内对过氧化值的贡献值不发生改变。将茶油和苯甲醇的过氧化值限度分别乘以各自在处方中的权重系数后相加,再加上庚酸炔诺酮的过氧化值滴定结果乘以其在处方中的比例(均以质量比计算),即得CNEI的过氧化值限度,应为0.061 27%。结果,除批号为100701的CNEI的过氧化值小于该限度以外,其余3批CNEI的过氧化值均超出了限度;而2008年生产的2批CNEI的过氧化值均比2010年生产的2批样品要高,证明了本品在贮存过程中,有过氧化物的增长。

3.3 苯甲醛与酸败度相关性

2010年版《中国药典》(二部)中规定苯甲醇中含苯甲醛不得超过0.2%,美国USP 32-NF27中规定苯甲酸苄酯中含苯甲醛不得超过0.05%。苯甲醛为CNEI辅料中的一个重要杂质,对CNEI中的苯甲醛采用气相色谱法进行测定,色谱见图1。

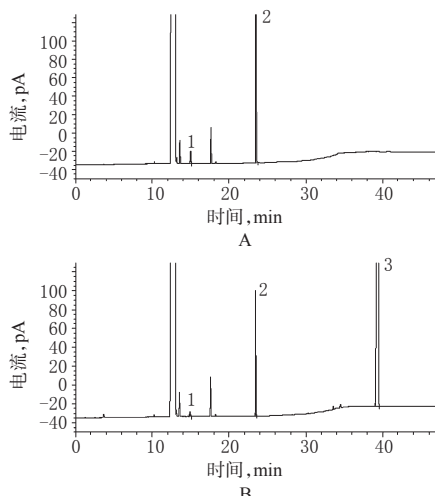


图1 气相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 苯甲醛; 2. 苯甲醇; 3. 苯甲酸苄酯(其余峰均为DMA峰)

Fig 1 GC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. benzaldehyde; 2. benzyl alcohol; 3. benzyl benzoate(all other peaks belong to DMA)

由于苯甲酸苄酯中的苯甲醛也主要是由其碱解为苯甲醇后氧化而来的,因此CNEI中苯甲醛的主要来源为苯甲醇。可以将样品中的苯甲醛以CNEI所含苯甲醇的量折算而得,结果详见表2。

表2 CNEI中苯甲醛的含量测定结果(m/V)

Tab 2 Result of content determination of benzylaldehyde in 4 batches of CNEI(m/V)

批号	CNEI中苯甲醛含量,%	CNEI中苯甲醇含量,%	苯甲醛含量(以CNEI中所含苯甲醇的量计),%
080502	0.085	2.08	4.08
080503	0.085	2.08	4.08
100701	0.007	2.26	0.31
100901	0.010	2.22	0.45

4批CNEI中苯甲醛含量的差异很大,2008年生产的2批样品中含苯甲醛均为2010年样品的10倍左右。可见,随贮存时间的延长,本品产生了较多苯甲醛,且均大大超出了2010年版《中国药典》(二部)对苯甲醇中含苯甲醛不得超过0.2%的要求。

为考察CNEI中苯甲醛含量与茶油的酸值或过氧化值的关系,采用OriginPro 8统计软件进行统计学分析,将4批样品的苯甲醛含量分别与各自测得的酸值及过氧化值进行相关性考察。对数据进行预分析,由于变量不呈双变量正态分布,不适合使用参数统计方法计算,因此采用非参数统计方法计算Spearman相关系数。结果,苯甲醛含量与酸值和过氧化值的Spearman相关系数均为0.949,单侧P值均为0.026,即在置信度(单侧)为0.05时,其相关性均是显著的,且呈正相关。根据上述结果,笔者推测茶油的酸败过程可能会加速苯甲醛的产生,同时苯甲醛大量产生能加剧茶油的酸败过程。本文所检测的4批CNEI可采用测定苯甲醛含量的方法预估辅料茶油的酸败度。

4 讨论

近年来,茶油在医药行业受到了越来越广泛的应用^[5]。注射用油的安全性指标除了常规的热原、细菌内毒素和无菌等项目外,辅料的酸败度也是一个重要的参考依据。作为具有安全高风险的注射剂,其辅料酸败后产生的有毒物质对人体的影响应受到高度重视。2010年版《中国药典》(一部)的茶油各论中无过氧化值检查项,笔者认为该项目是检验茶油质量高低的重要参数,也是茶油国家标准中的主要质量指标,建议在今后的药典修订中加以考虑。

CNEI的特殊性在于其辅料中还含有苯甲醇,且苯甲醇易氧化成为苯甲醛。苯甲醛的含量是影响本注射液安全性的另一个重要指标。由于本品中苯甲醛的含量与酸败程度呈显著正相关,贮存时间长的样品中苯甲醛的含量较高,且苯甲醛本身也有一定的毒性,故建议在CNEI的药典标准修订中增加苯甲醛的检查项,以更好地监控本注射液的质量。另外,对其他含苯甲醇的注射液中苯甲醛含量的监控也应加以重视。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:386-387.
- [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, 2010:1 182-1 183.
- [3] 李冬梅,王婧,毕良武,等. 提取方法对茶油中活性成分角鲨烯含量的影响[J]. 生物质化学工程, 2006, 40(1): 9.
- [4] 颜永刚,裴瑾,邓骞. 桃仁的酸败度测定及其限度值的分析[J]. 河南中医, 2010, 30(5): 510.
- [5] 李丽,吴雪辉,寇巧花. 茶油的研究现状及应用前景[J]. 中国油脂, 2010, 35(3): 10.

(收稿日期:2012-04-16 修回日期:2012-11-09)