

阿利维A酸原料药的微粉化工艺研究^Δ

杨玉金*,唐舒棠,王绍辉(重庆华邦制药有限公司研发中心,重庆 401121)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0914-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.12

摘要 目的:筛选阿利维A酸原料药的微粉化工艺。方法:以原料药粉碎后的粒径分布特征值 $[d(0.9)]$ 和杂质A含量为指标,筛选阿利维A酸原料药的粉碎方式(万能粉碎机、球磨机、气流粉碎机)、粉碎气源(压缩空气、高压氮气)、粉碎压力(0.2、0.4、0.6 MPa),并进行验证试验。结果:最优工艺为采用气流粉碎机以高压氮气作为气源在0.4 MPa下粉碎;验证试验中3批原料药粉碎后的粒径分别为8.57、8.55、8.54 μm (均小于10 μm , RSD=0.15%, $n=3$),杂质A的含量与未粉碎前比较未见增加(均为0.07%)。结论:筛选的阿利维A酸原料药的微粉化工艺操作可行、质量稳定。

关键词 阿利维A酸;微粉化工艺;粉碎工艺; $d(0.9)$;杂质A

少的干扰,故最终以此为检测波长。

表4 桑白皮中6种活性成分的含量测定结果(mg/g, $n=3$)

Tab 4 Results of content determination of 6 active components in *M. alba* (mg/g, $n=3$)

样品编号	新绿原酸	桑皮苷A	绿原酸	紫云英苷	桑根酮C	桑辛素
1	0.161 0	0.101	0.851	0.532	5.89	0.808
2	-	0.209	0.380	0.430	9.05	1.360
3	-	1.320	1.430	0.723	5.96	0.942
4	0.032 5	1.390	0.430	2.150	3.21	0.586
5	-	2.470	0.368	0.872	3.24	0.759
6	0.095 2	1.820	0.322	0.715	4.81	0.524

注:“-”表示未检测到

Note:“-”means not determined

3.4 提取方法的选择

在前期研究中,笔者比较了60%甲醇、80%甲醇、无水甲醇、无水乙醇和乙酸乙酯5种溶剂对6种成分提取效率的影响。结果显示,80%甲醇能兼顾不同极性化合物提取效率,提取效果最佳。同时,笔者还考察了超声提取法和热回流提取法两种方法对桑白皮样品提取的影响。结果显示,热回流提取法效率较高,并以提取1 h效果最佳。不同批次桑白皮药材的含量测定结果表明,桑白皮中含有大量的桑皮苷A、绿原酸、紫云英苷、桑根酮C和桑辛素,而新绿原酸含量较低。经方法学考察,本研究建立的联合含量测定方法简单可行、重现性好,可为桑白皮药材的质量控制,尤其是含有桑白皮或其活性组分降糖药物的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 王瑾,张会敏,石俊英.桑白皮黄酮类化学成分研究进展[J].药学研究,2012,31(7):420-422.
- [2] 段志涛,高英,周刚.桑白皮药材的质量标准研究[J].中药材,2013,36(4):553-557.

- [3] 闫辉,高欢,崔清华,等. HPLC同时测定桑白皮中4种成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(5):53-56.
- [4] 李墨灵,张哈,夏庆梅.桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展[J].西部中医药,2017,30(2):137-139.
- [5] 景王慧,吴文进,燕茹.归肺经中药桑白皮的化学、药理与药代动力学研究进展[J].世界中医药,2014,9(1):109-112.
- [6] 杨乐,陈泣.桑白皮研究进展[J].江西中医药大学学报,2007,19(3):98-100.
- [7] 董德刚,张秀英,刘小雪.桑白皮有效成分分离纯化的工艺研究[J].中国药房,2015,26(28):3960-3963.
- [8] 宋小地,翟西峰,冯家星,等.桑白皮和桑叶中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的虚拟筛选[J].中国药房,2017,28(4):508-511.
- [9] ZHANG M, CHEN M, ZHANG HQ, et al. In vivo hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*[J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(8):475-477.
- [10] CHEN Z, TAO H, LIAO L, et al. Quick identification of xanthine oxidase inhibitor and antioxidant from *Erycibe obtusifolia* by a drug discovery platform composed of multiple mass spectrometric platforms and thin-layer chromatography bioautography[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(16):2253-2259.
- [11] 徐小昆,陈志永,廖立平,等.丁公藤属植物中东莨菪苷、绿原酸、东莨菪素、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的含量测定[J].中国中药杂志,2015,40(6):1119-1122.
- [12] 王欣,王洪庆,康洁,等.桑葚的化学成分研究[J].药学学报,2014,49(4):504-506.
- [13] 郑云翀.桑活性成分促胰岛素分泌效果和机制的比较研究[D].上海:华东理工大学,2017.
- [14] 陈金川.紫云英苷的酶法合成及其抗氧化活性[D].扬州:扬州大学,2016.
- [15] 夏伯候,周亚敏,皮胜玲,等. UPLC测定桑叶中抗氧化活性成分异槲皮苷、芦丁和紫云英苷的含量[J].中药材,2016,39(3):586-589.

(收稿日期:2017-10-23 修回日期:2017-12-15)

(编辑:林静)

^Δ 基金项目:重庆市科技计划项目(No.cstc2014kjrc-qncr10002)

* 高级工程师。研究方向:药物合成、杂质控制。电话:023-67886946。E-mail:yjyang1979@126.com

Study on Micronization Technology of Alitretinoin Crude Drug

YANG Yujin, TANG Shutang, WANG Shaohui (R&D Center, Chongqing Huapont Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen the optimal micronization technology of Alitretinoin crude drug. METHODS: Using characteristic value of particle size distribution [$d(0.9)$] and the content of impurity A of crude drug after crushed as indexes, crushing method (universal pulverizer, ball crusher, airslide disintegrating mill), crushing gas source (compressed air, high pressure nitrogen) and crushing pressure (0.2, 0.4, 0.6 MPa) of Alitretinoin crude drug were screened, and validation test was also conducted. RESULTS: The optimal technology was as follows as airslide disintegrating mill, high pressure nitrogen as gas source, at 0.4 MPa. In validation test, particle sizes for 3 batches of crude drug after crushed were 8.57, 8.55, 8.54 μm ($<10 \mu\text{m}$, RSD=0.15%, $n=3$). The content of impurity A was not increased compared with before crushed (0.07%). CONCLUSIONS: Screened micronization technology of Alitretinoin crude drug is feasible and stable in quality.

KEYWORDS Alitretinoin; Micronization technology; Crushing technology; $d(0.9)$; Impurity A

阿利维 A 酸 (Alitretinoin) 是一种内源性维甲酸, 维甲酸类化合物包含了维生素 A 系列的代谢产物及其合成类似物。临床研究表明, 维甲酸能调节多种代谢, 促进细胞生长和运转, 如细胞分化、增殖和凋亡^[1]。阿利维 A 酸被证实可以用于 3 种恶性肿瘤即神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤以及慢性手部湿疹的治疗^[1-4]。1999 年, 美国 FDA 批准 0.1% 阿利维 A 酸凝胶剂用于治疗卡波济肉瘤^[5]; 2009 年 11 月, 加拿大批准阿利维 A 酸软胶囊上市, 用于局部外用强效糖皮质激素无效的慢性手部湿疹患者。

药物在人体内的吸收速度常常由溶解性决定, 固体制剂中的药物在被吸收前, 必须经过崩解和溶解然后转为溶液的过程, 如果药物不易从制剂中释放出来或药物的溶解速度极为缓慢, 则该制剂中药物的吸收速度或吸收程度均达不到被人体吸收而发挥药效的要求; 另一方面, 某些药理作用剧烈、安全指数小、吸收迅速的药物如果溶出速度太快, 可能产生明显的不良反应, 且维持药效的时间也将缩短。在这种情况下, 必须对制剂中药物的溶出速率进行控制^[6-9]。原料药粒径是影响制剂溶出速率的关键质量属性。研究表明, 阿利维 A 酸的生物药剂学分类为 IV 类, 其在水中的溶解度极低^[10]。因此, 阿利维 A 酸释放过快或者过慢均不利于其在体内的吸收, 其溶解行为对生物利用度有极大的影响。为了能够有效控制阿利维 A 酸制剂的释放速度, 将其控制在合理范围内, 必须对阿利维 A 酸的粒径分布进行有效控制。由于阿利维 A 酸为共轭多烯类化合物, 在空气中极易吸潮氧化, 在制剂研究中对其开展粒径控制的文献报道较少, 笔者对其进行了相关的粉碎工艺研究, 以期制备可供制剂生产的粒度合格的阿利维 A 酸原料药提供参考, 同时为这类原料药的粒度控制方法的建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

YQ100-1 气流粉碎系统 (上海赛山粉体机械制造有限公司); Malvern Mastersizer 2000 激光粒度分析仪和

Hydro 2000 MU 湿法进样器 (英国马尔文仪器有限公司); LC2010A 高效液相色谱仪 (日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

阿利维 A 酸对照品/原料药 (重庆华邦胜凯制药有限公司, 批号: ALI-160301, 纯度: 99.90%, 杂质 A: 0.07%); 阿利维 A 酸杂质 A (阿利维 A 酸氧化杂质, 批号: ALI-A-151201, 纯度: 98.90%)、杂质 B (维 A 酸, 批号: TRA-160204, 纯度: 99.78%)、杂质 C (异维 A 酸, 批号: ISO-160101, 纯度: 99.85%)、杂质 D (11-cis-维 A 酸, 批号: ALI-D-160201, 纯度: 98.67%) 对照品均来源于重庆华邦制药有限公司; 聚山梨酯 80、甲醇、冰乙酸、正己烷、十二烷基磺酸钠等均为分析纯, 均来源于国药化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 粒度测定方法

2.1.1 进样方式和进样器的选择

参考 2015 年版《中国药典》(四部) 方法^[11], 分别选用干法进样器和湿法进样器对微粉后的成品进行测定。结果显示, 湿法进样器下成品的粒径测定结果与显微镜下标尺测量结果更为接近, 由于阿利维 A 酸原料药的粒径分布特征值 [$d(0.9)$], 代表占总粒子量 90% 的粒子对应的粒径] 均小于 20 μm , 干法进样器的测定结果受到本品分散效率的影响, 与显微镜下的观察结果差异较大, 故选择湿法进样器进行后续试验中本品粒度的测定。

2.1.2 测定条件的确定

参考 2015 年版《中国药典》(四部) 方法^[11], 在前期试验中, 对测定方法中各条件 [包括: 分散介质 (水、己烷)、分散剂 (0.2% 聚山梨酯 80 水溶液、0.1% 十二烷基磺酸钠水溶液)、吸光度 (0.01、0.005、0.02)、搅拌速度 (800、1 000、1 200、1 500、1 600、1 900 r/min)、平衡时间 (0.5、1、2、3、4、5 min)、测量时间 (2、5、10、20 s)] 以及供试品溶液制备方法等进行筛选, 确定最优的测定条件如下。

(1) 分散介质: 水; 分散剂: 0.2% 聚山梨酯 80 水溶液; 成品折射率: 1.678; 成品吸光度: 0.01; 分散介质折射

率:1.33;搅拌速度:1 500 r/min;平衡时间:1 min;测量时间:10 s;遮光度范围:5%~15%;分析模型:通用模型;结果类型:体积分布。

(2)供试品溶液制备:称取微粉阿利维 A 酸样品约 30 mg,置于 50 mL 烧杯中,加 30 mL 分散剂,超声(频率:40 kHz,功率:120 W)并搅拌 25 min,即得到分散均匀的供试品溶液。

2.1.3 测定方法

在湿法进样器中加入 800 mL 分散介质,系统对光及背景扣除完成后,加入供试品溶液,使遮光比在 5%~15%,平衡 1 min 后开始测定,重复测定 5 次,记录 $d(0.9)$,取平均值。

2.1.4 测定方法验证结果

参照《中国药典》要求^[1]对上述粒度测定方法进行系统方法验证。经方法验证结果表明,采用此方法测定本品粒度,满足粒径测定结果。平行 6 次测定结果的 $RSD[d(0.1)]\leq 10\%$, $RSD[d(0.5)]\leq 6\%$, $RSD[d(0.9)]\leq 10\%$,符合 2015 年版《中国药典》(四部)通则粒度方法中第三法^[1]的相关规定。

2.2 有关物质含量测定方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Sphorisorb ODS1 (150 mm×4.6 mm, 3 μm);流动相:甲醇-水-冰乙酸=(700:294:6, V/V/V);采用紫外检测器,检测波长:350 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2.2 溶液制备

(1)供试品溶液:称取待测样品 20 mg,置于 20 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

(2)自身对照溶液:精密吸取供试品溶液 1.0 mL,置于 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

(3)杂质 B 对照品贮备液:称取杂质 B 对照品 20 mg,置于 20 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

(4)阿利维 A 酸对照品贮备液:称取阿利维 A 酸对照品 20 mg,精密称定,置于 20 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

(5)系统适用性溶液:精密移取阿利维 A 酸对照品贮备液 1.0 mL 和杂质 B 对照品贮备液 0.5 mL,置于同一 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

(6)杂质定位溶液:分别称取杂质 A、杂质 C、杂质 D 对照品 20 mg,精密称定,分别置于 3 个不同的 20 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质 A、杂质 C、杂质 D 对照品溶液。移取杂质 A 对照品溶液 0.15 mL,杂质 C、杂质 D 对照品溶液各 0.1 mL,杂质 B 对照品贮备液 0.5 mL,置于同一 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 测定方法

(1)取杂质定位溶液进样,记录色谱图,各杂质出峰顺序分别为杂质 A、杂质 C、杂质 D、杂质 B。

(2)取系统适用性溶液进样 6 次,记录色谱图,阿利维 A 酸与杂质 B 峰的峰面积 RSD 均未超过 2.0% (如超过,本次试验结果不可用)。

(3)取供试品溶液进样,记录色谱图(供试品溶液记录色谱图中如有与杂质定位溶液记录色谱图中杂质 A、杂质 C、杂质 D、杂质 B 保留时间一致的色谱峰,则判定供试品溶液中的杂质为杂质 A、杂质 C、杂质 D、杂质 B)。

(4)取自身对照溶液进样,记录色谱图,计算杂质含量。

①杂质含量计算公式如下:

外标法计算杂质 B 含量公式:杂质 B (%) = $(A_{\text{样}} \times C_{\text{对}}) / (C_{\text{样}} \times A_{\text{对}}) \times P_s \times 100\%$ 。式中: $A_{\text{样}}$ 为供试品溶液中杂质 B 峰的峰面积; $C_{\text{样}}$ 为供试品溶液的质量浓度 (μg/mL); $A_{\text{对}}$ 为杂质 B 对照品溶液中主峰的峰面积; $C_{\text{对}}$ 为杂质 B 对照品溶液的质量浓度 (μg/mL); P_s 为杂质 B 对照品的纯度 (%)。

②其余杂质含量计算公式: $X(\%) = A_x / A_{\text{自}} \times RRF \times 100\%$ 。式中, A_x 为供试品溶液中其余杂质 (除杂质 B 外) 的峰面积; $A_{\text{自}}$ 为自身对照溶液中阿利维 A 酸主峰的峰面积; RRF 为校正因子 (杂质 A 的相对校正因子为 1.217 1, 杂质 C 的相对校正因子为 0.963 0, 杂质 D 的相对校正因子为 2.179 0, 未知杂质按 1 计算)。

③总杂质含量计算公式:总杂质 = 已知杂质总量 (%) + 未知杂质总量 (%)

2.3 原料药粉碎方法筛选

取适量纯度为 99.87% 的阿利维 A 酸原料药,分别用万能粉碎机 (转速:2 500 r/min)、球磨机 (转速:2 500 r/min) 以及气流粉碎机 (高压氮气, 0.6 MPa 粉碎压力) 进行粉碎试验。按“2.1”项下方法进行粒度测定。按“2.2”项下方法用色谱法进行有关物质测定以及纯度 [纯度 (%) = 100% - 总杂质含量] 计算,结果见表 1。

表 1 不同粉碎方法下粉碎阿利维 A 酸的 $d(0.9)$ 、杂质 A 含量及纯度

Tab 1 The $d(0.9)$, contents of impurity A and purity of alitretinoin prepared by different crushing methods

试验号	粉碎方法	$d(0.9)$, μm	杂质 A 含量, %	纯度, %
1	万能粉碎机粉碎	25.12	0.56	99.21
2	球磨机粉碎	12.03	0.42	99.17
3	气流粉碎机粉碎	7.96	0.07	99.87

从表 1 可以看出,阿利维 A 酸采用万能粉碎机和球磨机进行粉碎后 $d(0.9)$ 均大于 10 μm,而且在粉碎过程中杂质 A 分别由 0.07% 增加到了 0.56% 和 0.42%,超出了制剂质量要求。采用气流粉碎机进行粉碎, $d(0.9)$ 均小于 10 μm,杂质增加不明显。因此选用气流粉碎机对阿利维 A 酸进行粉碎。

2.4 气流粉碎机的气源筛选

在同一气流粉碎机上分别用压缩空气和高压氮气在粉碎压力为0.6 MPa下对阿利维A酸进行粉碎,检测样品,结果见表2。

表2 不同气源下粉碎阿利维A酸的 $d(0.9)$ 、杂质A含量及纯度

Tab 2 The $d(0.9)$, contents of impurity A and purity of alitretinoin crushed by different gas sources

试验编号	粉碎气源	$d(0.9), \mu\text{m}$	杂质A含量, %	纯度, %
1	压缩空气	8.15	0.22	99.54
2	高压氮气	7.96	0.07	99.87

从表2可知,采用压缩空气作为气源,阿利维A酸粉碎过程中杂质A由0.07%增加到0.22%,增加明显;采用高压氮气作为气源,阿利维A酸粉碎过程中杂质不变,无增加趋势。

2.5 气流粉碎机粉碎压力筛选

在同一气流粉碎机上,采用高压氮气作为气源,采用不同的逐步降低的粉碎压力对阿利维A酸进行气流粉碎,检测样品,结果见表3。

表3 不同粉碎压力下粉碎阿利维A酸的 $d(0.9)$ 、杂质A含量及纯度

Tab 3 The $d(0.9)$, contents of impurity A and purity of alitretinoin crushed by different pressures

试验号	粉碎压力, MPa	$d(0.9), \mu\text{m}$	杂质A含量, %	纯度, %
1	0.2	11.21	0.07	99.87
2	0.4	8.52	0.07	99.87
3	0.6	7.96	0.07	99.87

从表3可以看出,当粉碎压力分别为0.2、0.4、0.6 MPa时,粉碎得到的阿利维A酸粒径分布 $d(0.9)$ 分别为11.21、8.52、7.96 μm ,因此粉碎压力为0.4、0.6 MPa时可以满足粉碎后 $d(0.9)$ 小于10 μm 的要求,而且粉碎过程中杂质不增加,纯度不下降。

2.6 验证试验

在同一气流粉碎机上,采用高压氮气作为气源,粉碎压力为0.4 MPa,进行3.0 kg阿利维A酸原料药的粉碎,3批样品测定结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation test

试验号	$d(0.9), \mu\text{m}$	杂质A含量, %	纯度, %
1	8.57	0.07	99.87
2	8.55	0.07	99.87
3	8.54	0.07	99.87

从表4可以看出,当采用高压氮气为气源,粉碎压力为0.4 MPa时粉碎得到的阿利维A酸 $d(0.9)$ 的均值为8.55 μm ,3批粒度分布的RSD为0.15%,粉碎过程中杂质不增加,纯度不下降。由此证明此工艺条件稳定可靠。

3 讨论

为解决对空气敏感的阿利维A酸原料药的粒度分布控制的问题,笔者采用了3种不同粉碎方法,并对筛选

得到的最优方法气流粉碎法的气源和粉碎压力进行了筛选,以粉碎后原料药的粒度分布、杂质增长情况和原料药的纯度为指标考察了3种粉碎方法优劣。以高压氮气为气源,在惰性气体的保护下,阿利维A酸原料药粉碎过程中不与氧气接触,避免了氧化杂质的增大;在粉碎压力为0.4 MPa时,气流粉碎机磨盘中物料对撞力度足以将阿利维A酸原料药颗粒粉碎至 $d(0.9)$ 为10 μm 以下。最终确定了工业化粉碎阿利维A酸原料药的方法。提供了在空气中对易氧化的化合物批量粉碎的新方法。

参考文献

- [1] REDFERN CPF, LOVAT PE, MALCOLM AJ, et al. Gene expression and neuroblastoma cell differentiation in response to retinoic acid: differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid[J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31(4): 486-494.
- [2] BOLLAG W, OTT F. Successful treatment of chronic hand eczema with oral 9-cis-retinoic acid[J]. *Dermatology*, 1999, 199(4): 308-312.
- [3] KARLY P, GARNOCK J, CAROLINE MP. Alitretinoin in severe chronic hand eczema[J]. *Drugs*, 2009, 69(12): 1625-1634.
- [4] BLAIR HA, SCOTT LJ. Alitretinoin: a review in severe chronic hand eczema[J]. *Drugs*, 2016, 76(13): 1271-1279.
- [5] CALEB C, JASON M, NOAH S. Alitretinoin: a comprehensive review[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(3): 437-443.
- [6] BROUWERS J, BREWSTER ME, AUGUSTIJNS P. Supersaturating drug delivery systems: the answer to solubility-limited oral bioavailability? [J]. *J Pharma Sci*, 2009, 98(9): 2549-2572.
- [7] 王燕, 牟聪, 刘金凤, 等. 替格瑞洛原料药粒径对其片剂体外溶出行为的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(1): 119-121.
- [8] 钟潇骁, 曹雯, 杨必勇, 等. 布地奈德鼻喷雾剂粒度分布的测定及一致性分析[J]. *中国药房*, 2017, 28(18): 2560-2563.
- [9] 张庆刚, 程刚. 盐酸厄洛替尼不同粒径分布对其片剂溶出行为的影响[J]. *食品与药品*, 2015, 17(2): 83-86.
- [10] SAKET B, RITU G, RAVINDRA PS, et al. Effects of solubility and dissolution characteristics on oral bioavailability of alitretinoin[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 2016, 5(1): 40-49.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 132-134.

(收稿日期: 2017-10-09 修回日期: 2017-11-16)

(编辑: 刘萍)