

比沙可啶原料药和肠溶片中有关物质测定方法研究

张西如*, 孙 婷, 郭永辉, 刘红莉, 赫晓军, 苗会娟, 盖 成(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-2995-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.38

摘要 目的:建立测定比沙可啶原料药和肠溶片中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hibar C₁₈,流动相为乙腈-20 mmol/L 乙酸铵溶液(冰乙酸调pH至5.0)(55:45, V/V),检测波长为265 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:在该色谱条件下各杂质及其与主成分之间均分离良好;比沙可啶检测质量浓度线性范围为0.25~5.0 mg/ml($r=0.9999$);比沙可啶以及杂质A、B、C、D、E的检测限和定量限分别为19~25 ng和61~68 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;比沙可啶回收率为99.50%~101.00%,RSD=0.5%($n=9$)。结论:该方法专属性强、灵敏度高、重复性好,可用于比沙可啶原料药和肠溶片剂中有关物质的测定。

关键词 高效液相色谱法;比沙可啶;原料药;肠溶片;有关物质

Study on the Determination Method for Related Substances in Bisacodyl Raw Material and Enteric-coated Tablet

ZHANG Xiru, SUN Ting, GUO Yonghui, LIU Hongli, HE Xiaojun, MIAO Huijuan, GE Cheng (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in bisacodyl raw material and enteric-coated tablet. METHODS: HPLC was performed on the column of Hibar C₁₈ with mobile phase of acetonitrile -20 mmol/L ammonium acetate (acetic acid adjust pH to 5.0) (55:45, V/V), detection wavelength was 265 nm, flow rate was 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of bisacodyl was 0.25-5.0 mg/ml ($r=0.9999$); the limits of detection and quantification were 19-25 ng and 61-68 ng for bisacodyl and impurity A, B, C, D and E; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 99.50%-101.00% (RSD=0.5%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive and reproducible, and can be used for the determination of related substance in bisacodyl raw material and enteric-coated tablet.

KEYWORDS HPLC; Bisacodyl; Raw material; Enteric-coated tablet; Related substances

比沙可啶(Bisacodyl)是由德国勃林格殷格翰(Boehringer-Ingelheim)集团开发的通便剂^[1],临床上主要通过与其肠黏膜直接接触刺激其感觉神经末梢而增强肠反射性蠕动,导致排便。比沙可啶制剂类型主要有肠溶片剂和栓剂,其肠溶片剂优点是当其到达特定部位结肠时,药物自片中释出,直接作用于结肠,而无继发性腹泻作用^[2]。其所执行的标准收载于《中国药典》2015年版(二部),该标准中采用薄层色谱法(TLC)检查其有关物质^[3]。目前,国内关于比沙可啶原料药和肠溶片中有关物质的测定方法的报道尚少,流动相系统有采用乙腈-水的^[4-5],也有采用甲醇-水-冰乙酸的^[6],但均具有一定的局限性,即检出的杂质不够全面。为此,本研究参照相关文献^[7-9],建立了采用高效液相色谱法(HPLC)测定比沙可啶原料药和肠溶片中有关物质的方法,能够检出更多的已知杂质,且分离度良好,可为更全面地控制其质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1311C四元泵、G1329B自动进样器、G1316A柱温箱、G1314紫外可变波长检测器和EZChrom色谱工作站等(美国Agilent公司);XS105型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ5200DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

比沙可啶对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100181-200402,纯度:100%,105 ℃干燥2 h后使用);杂质A、杂质E对照品(加拿大TRC公司,批号:2-MMH-159-2、4-BLL-167-1,纯度均为100%);杂质B、杂质C、杂质D对照品(加拿大TLC公司,批号:1686-061A5、1722-017A5、1735-043A1,纯度均为100%);比沙可啶原料药(A公司,批号:

[6] 叶超,刘芳,陈宝龙,等.高效液相色谱法测定广藿香中毛蕊花糖苷的含量[J].中南药学,2014,12(12):1 248.

[7] 赵群涛,张红伟,方永凯,等.HPLC法同时测定芪黄疏糖胶囊中梓醇和毛蕊花糖苷的含量[J].中华中医药学刊,2014,32(5):1 200.

[8] 陈天朝,翟来超.HPLC同时测定地黄中梓醇与毛蕊花糖

苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):105.

[9] 许永,赵成.HPLC法同时测定养血安神片中梓醇与毛蕊花糖苷的含量[J].安徽医药,2014,18(10):1 859.

[10] 李文斌.HPLC法测定麦味地黄丸中毛蕊花糖苷的含量[J].中国药房,2014,25(28):2 665.

(收稿日期:2016-01-16 修回日期:2016-04-13)

(编辑:刘 柳)

* 主任药师。研究方向:药物分析。电话:0311-85212009。
E-mail:122547652@qq.com

201301A、201302B);比沙可啶肠溶片(A公司,批号:30901、12053、11092,规格均为5 mg);乙腈(色谱纯,美国Fisher Chemical公司);乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);冰乙酸(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hibar C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-20 mmol/L乙酸铵溶液(冰乙酸调pH至5.0)(55:45,V/V);检测波长:265 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取比沙可啶肠溶片样品适量,除去包衣,研细,精密称取适量(约相当于比沙可啶50 mg),或者精密称取比沙可啶原料药50 mg,置于50 ml量瓶中,加乙腈25 ml,适量超声(功率:200 W,频率:40 kHz)5 min使溶解,冷却至室温,用冰醋酸-乙腈-水(4:30:66,V/V/V)混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.2 对照溶液 精密量取“2.2.1”项下供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,加上上述混合溶剂稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取比沙可啶对照品100 mg,置于10 ml量瓶中,加“2.2.1”项下混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 取比沙可啶和杂质A、B、C、D、E对照品各适量,精密称定,分别加乙腈1 ml溶解,再用“2.2.1”项下混合溶剂稀释制成每1 ml中约含比沙可啶和杂质A、B、C、D、E各1 mg的混合溶液,作为系统适用性溶液。

2.2.5 空白辅料溶液 取生产厂家比沙可啶肠溶片处方中的所有辅料各适量,精密称定,按“2.2.1”项下方法操作,制备空白辅料溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 分别取“2.2”项下系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液和空白辅料溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可见,比沙可啶峰的保留时间约为21 min,理论板数按比沙可啶峰计≥3 000,拖尾因子≤1.5;且在该色谱条件下,杂质A、B、C、D、E之间及其与主成分之间均分离良好。

2.3.2 专属性试验 (1)酸破坏。取比沙可啶肠溶片样品适量,除去包衣,研细,精密称取适量(约相当于比沙可啶50 mg),置于50 ml量瓶中,加入2 mol/L的盐酸溶液1 ml,破坏10 min,再用2 mol/L的氢氧化钠溶液调至中性,加乙腈约25 ml溶解并用“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过。(2)碱破坏。取比沙可啶肠溶片样品适量,除去包衣,研细,精密称取适量(约相当于比沙可啶50 mg),置于50 ml量瓶中,加入2 mol/L的氢氧化钠溶液1 ml,破坏10 min,再用2 mol/L的盐酸溶液调至中性,加乙腈约25 ml溶解并用“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过。(3)高温破坏。取比沙可啶肠溶片样品适量,放置烘箱中,60 ℃加热24 h,放冷,除去包衣,精密称取适量(约相当于比沙可啶50 mg),置于50 ml量瓶中,加乙腈约25 ml溶解并用“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过。(4)氧化破坏。取比沙可啶肠溶片样品适量,除去包衣,精密称取适量(约相当于比沙可啶50 mg),置于50 ml量瓶中,加入30%过氧化氢溶液2 ml,破坏10 min,加乙腈约25 ml溶解并用“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过。(5)光照

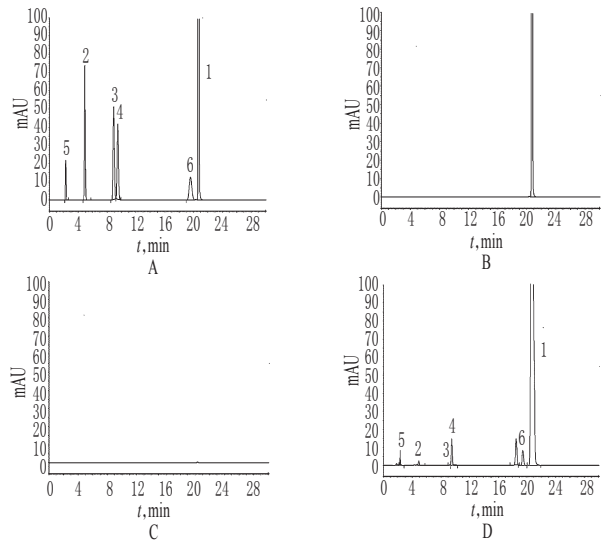


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.对照品溶液;C.空白辅料溶液;D.供试品溶液;1.比沙可啶;2.杂质A;3.杂质B;4.杂质C;5.杂质D;6.杂质E

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A.system suitability test solution; B.reference substance; C.blank control solution; D.test sample solution; 1.bisacodyl; 2.impurity A; 3.impurity B; 4. impurity C; 5.impurity D; 6.impurity E

破坏。取比沙可啶肠溶片样品适量,除去包衣,研细,精密称取于4 500 lx光照射24 h后的内容物适量(约相当于比沙可啶50 mg),置于50 ml量瓶中,加乙腈约25 ml溶解并用“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过。取上述5种溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可见,样品经酸、碱、高温、氧化、光照破坏条件处理后各杂质峰均能与主峰完全分离。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.3”项下的对照品溶液0.25、0.5、0.75、1.0、2.5、5.0 ml,置于不同的10 ml量瓶中,加“2.2.1”项下混合溶剂稀释至刻度,摇匀,各精密量取20 μl,按“2.1”项下色谱条件注入HPLC仪进样测定,记录峰面积。以比沙可啶质量浓度(x,mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程为 $y=5.98 \times 10^4 x + 4.9 \times 10^6$ ($r=0.9999$)。结果表明,比沙可啶检测质量浓度线性范围为0.25~5.0 mg/ml($r=0.9999$)。

2.5 检测限与定量限考察

精密量取“2.2.4”项下系统适用性溶液适量,用“2.2.1”项下混合溶剂逐级稀释,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。按信噪比为10:1计算得到定量限,按信噪比为3:1计算得到检测限。结果,比沙可啶以及杂质A、B、C、D、E的检测限和定量限分别为23和66、21和62、24和61、20和63、19和67、25和68 ng。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.4”项下的系统适用性溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,连续测定6次,记录峰面积。结果,比沙可啶以及杂质A、B、C、D、E峰面积的RSD分别为0.4%、1.0%、1.2%、1.4%、1.1%、0.9%($n=6$),表明仪器精密度较好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.4”项下的系统适用性溶液适量,在室温条件下放置0、1、2、4、6、8、12 h时分别精密量取20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,比沙可啶以及杂质A、B、C、D、E峰面积的RSD分别为0.5%、0.7%、0.6%、0.8%、0.9%、

0.7% ($n=7$), 表明系统适用性溶液在室温条件下放置 12 h 内基本稳定。

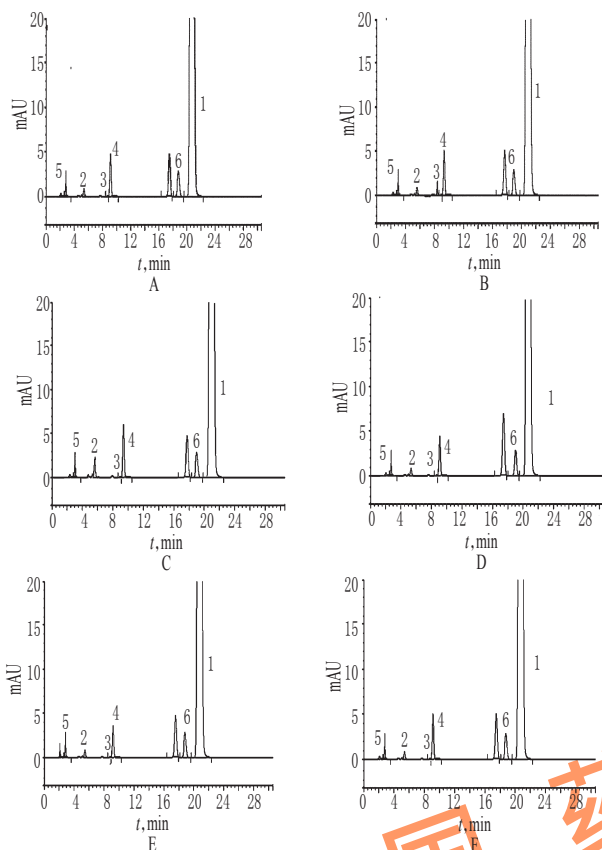


图2 专属性试验高效液相色谱图

A. 光破坏; B. 酸破坏; C. 碱破坏; D. 高温破坏; E. 氧化破坏; F. 未破坏; 1. 比沙可啶; 2. 杂质 A; 3. 杂质 B; 4. 杂质 C; 5. 杂质 D; 6. 杂质 E

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. sample destroyed by light; B. sample destroyed by acid; C. sample destroyed by base; D. sample destroyed by heat; E. sample destroyed by heat; F. undestroyed sample; 1. bisacodyl; 2. impurity A; 3. impurity B; 4. impurity C; 5. impurity D; 6. impurity E

2.8 重复性试验

取肠溶片样品(批号: 12053)适量, 共 6 份, 分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液和按“2.2.2”项下方法制备对照溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 比沙可啶以及杂质 A、B、C、D、E 峰面积的 RSD 分别为 0.7%、0.4%、0.8%、0.5%、0.7%、0.8% ($n=6$), 表明本方法重复性较好。

2.9 回收率试验

按肠溶片样品处方取处方量空白辅料, 共 9 份, 每 3 份为一组, 分别精密加入相当于比沙可啶处方量 80%、100%、120% 的对照品溶液各适量, 按“2.2.1”项下方法制成供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算回收率, 结果见表 1。

2.10 样品有关物质测定

取 2 批原料药和 3 批肠溶片剂样品各适量, 分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液和按“2.2.2”项下方法制备对照溶液, 以自身对照法测定并计算含有关物质的量。其中, 供试品溶液中单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 1.5 倍 (1.5%); 总杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 3 倍 (3.0%)。测定结果见表 2。

3 讨论

比沙可啶肠溶片现行质量标准中采用 TLC 法测定样品的

表 1 回收率试验结果 ($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=9$)

加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
8.00	7.96	99.50		
7.97	7.95	99.74		
7.94	7.97	100.37		
9.96	10.02	100.60		
9.88	9.91	100.30	100.3	0.5
9.89	9.93	100.40		
11.97	12.02	100.41		
11.93	12.00	100.58		
11.95	12.07	101.00		

表 2 样品有关物质测定结果 ($n=2, %$)

Tab 2 Results of related substances determination of samples ($n=2, %$)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C	杂质 D	杂质 E	未知单杂	总杂质
201301A	0.07		0.1		0.2	0.1	0.5
201302B	0.06		0.2		0.3	0.1	0.7
30901	0.06		0.7		0.1	0.1	1.0
12053	0.06		0.7		0.3	1.5	2.6
11092	0.03		0.3	0.01	0.3	0.4	1.0

有关物质, 测定方法的灵敏度和专属性较低, 未对样品中有关物质进行准确定量。而已报道的文献中采用的检测方法又无法全面地分析比沙可啶的已知杂质。本研究通过采用 HPLC 法, 一次性检测出 5 种已知杂质, 且测定方法准确度高、可信性强, 既填补了全面监控比沙可啶有关物质方面的空白, 又为保障患者用药安全提供了有效的手段。

此次研究结果表明, 比沙可啶原料药和肠溶片中均检出杂质 A、C、E, 可初步判断此 3 种杂质由原料引入, 故在其质量标准中加入已知杂质的检测是极为重要的, 不仅能够更好地与国际检测水平接轨, 而且可为临床预防其药品不良反应的发生提供参考。

综上所述, 本方法专属性强、灵敏度高、重复性好, 可用于比沙可啶原料药和肠溶片中有关物质的测定, 并可为比沙可啶原料药和肠溶片质量标准的建立和提高提供依据。

参考文献

- [1] 张军辉, 刘英华, 李金岭. 比沙可啶的合成工艺研究[J]. 精细化工中间体, 2012, 42(2): 30.
- [2] 李颖, 刘世宽, 郝志刚. 结肠定位给药制剂: 比沙可啶速释片的研制[J]. 山东医药工业杂志, 2000, 19(3): 7.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 56.
- [4] 王卉, 杜春波, 沈立, 等. RP-HPLC 法测定比沙可啶片剂含量及有关物质[J]. 药学进展, 2005, 29(12): 565.
- [5] 王卉, 叶小敏, 蔡振利, 等. 比沙可啶对照品的建立[J]. 中国药师, 2009, 12(7): 860.
- [6] 袁志江, 李晓红. HPLC 法测定比沙可啶肠溶片的有关物质[J]. 中国药事, 2009, 23(8): 799.
- [7] The United States Pharmacopeial Convention. USP37-NF 32[S]. 2014.
- [8] 万红艳, 张晴. HPLC 法测定富马酸替诺福韦二吡啶酯原料药和胶囊中的有关物质[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 848.

(收稿日期: 2016-01-02 修回日期: 2016-06-14)

(编辑: 周 箐)