

盐酸小檗胺片溶出度测定方法的建立及其体外溶出性能评价^Δ

董宁^{1,2*}, 刘慧颖², 孙立新^{1#}(1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2356-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.12

摘要 目的:建立盐酸小檗胺片溶出度的测定方法,评价5家企业样品的批内质量。方法:采用高效液相色谱法测定盐酸小檗胺浓度并计算累积溶出度。色谱柱为Agilent C₁₈,流动相为0.02 mol/L磷酸氢二钾溶液(含0.2%三乙胺,磷酸调pH至6.8)-乙腈(60:40, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为282 nm,柱温为35 ℃,进样量为40 μL。采用桨法,以累积溶出度为指标,筛选溶出介质(水、pH 5.5醋酸-醋酸钠缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液)和转速(50、75 r/min),确定溶出度测定的条件。绘制5家企业样品的溶出曲线,比较批内均一性。结果:盐酸小檗胺检测质量浓度线性范围为3.96~257.40 μg/mL($r=0.999\ 9$),精密度、稳定性(8 h)、重复性、耐用性试验的RSD均<2.0%($n=5$ 或 $n=6$),平均回收率为98.6%(RSD=1.64%, $n=9$)。在3种溶出介质及2种转速下药物累积溶出度无明显差异,最终确定水为溶出介质、转速为50 r/min。在5家企业样品中,只有1家企业的样品批内均一性较好。结论:所建立的溶出度测定方法简便易行、准确度高,可用于盐酸小檗胺片中盐酸小檗胺的溶出度测定;部分企业需进一步提高药品质量。

关键词 盐酸小檗胺片;桨法;溶出度;高效液相色谱法

Establishment of Dissolution Tests and Evaluation of Dissolution Performance for Berbamine Hydrochloride Tablets

DONG Ning^{1, 2}, LIU Huiying², SUN Lixin¹ (1.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2.Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for determining the dissolution of Berbamine hydrochloride tablets, and to evaluate the intra-batch quality of samples from 5 enterprises. METHODS: The concentration of berbamine hydrochloride was determined by HPLC and accumulative dissolution was calculated. The determination was performed on Agilent C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.02 mol/L dipotassium hydrogen phosphate solution (containing 0.2% triethylamine, pH adjusted to 6.8 with phosphoric acid)-acetonitrile (60:40, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 282 nm. The column temperature was set at 35 ℃, and sample size was 40 μL. With paddle method, using accumulative dissolution as index, the medium (water, pH 5.5 acetic acid-sodium acetate buffer solution, pH 6.8 phosphate buffer solution) and rotation speed (50, 75 r/min) were selected to establish the determination condition of dissolution. The dissolution curves of 5 enterprises were drawn to compare the intra-batch uniformity of samples. RESULTS: The linear range of berbamine hydrochloride were 3.96-257.40 μg/mL ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability (8 h), reproducibility and durability tests were all lower than 2.0% ($n=5$ or $n=6$). The average recoveries were 98.6% (RSD=1.64%, $n=9$). The accumulative dissolution of samples in 3 kinds of mediums at 2 kinds of rotation speeds had no obvious differences. The optimal determination condition was water as medium at rotation speed of 50 r/min. Of all the five enterprises, intra-batch uniformity of sample was satisfied in only on enterprise. CONCLUSIONS: Established method is simple, feasible and accurate, and it can be used to determine the dissolution of berbamine hydrochloride in Berbamine hydrochloride tablets. Some enterprises should make further efforts to improve the quality of medicines.

KEYWORDS Berbamine hydrochloride tablets; Paddle method; Dissolution; HPLC

小檗胺是从小檗科小檗属植物细叶小檗等中草药植物中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱^[1],分子式为C₃₇H₄₀N₂O₆,药用其盐酸盐,为钙调素拮抗药,其制剂为盐酸小檗胺片。小檗胺为天然提取物,药理作用广泛、不

良反应小、长期毒性低^[2],为促进白细胞增生药;此外,还具有增强机体免疫力、抗结核、扩张血管、抗心肌缺氧缺血、抗心律失常等作用,主要用于各种原因引起的白细胞减少症,亦可用于预防癌症放疗、化疗后白细胞减少^[3]。

盐酸小檗胺片的质量标准收载于国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第十三册^[3],现有质量标准未对溶出度进行控制,无法评价该药物体外溶出情况。鉴于此,笔者建立了高效液相色谱(HPLC)法测定

^Δ 基金项目:国家药典委员会药品标准提高课题(No.239)

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:024-31266233。E-mail:dongning822@126.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:药品质量标准。电话:024-43520600。E-mail:slx04@163.com

盐酸小檗胺片溶出度的方法^[4-6],并对5家企业的样品批内均一性进行了评价。

1 材料

1.1 仪器

1200 HPLC 仪,配备紫外检测器(美国 Agilent 公司);2487HPLC 仪,配备二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);XP205 天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);Orion 3-Star 酸度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RCZ-8M 溶出试验仪,配备 RZQ-8D 取样收集系统(天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸小檗胺片:企业 A(薄膜衣片,批号:100101)、企业 B(糖衣片,批号:100602)、企业 C(糖衣片,批号:100101)、企业 D(素片,批号:20100801)、企业 E(糖衣片,批号:10072331),规格均为 28 mg/片(相当于含小檗胺 25 mg);盐酸小檗胺对照品(北京世纪奥科生物技术有限公司,批号:160113,纯度:≥98%);盐酸小檗胺原料(企业 A);乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 溶出度方法的建立

2.1 溶出度测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.02 mol/L 磷酸氢二钾溶液(含 0.2% 三乙胺,磷酸调 pH 至 6.8)-乙腈(60:40, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:282 nm;柱温:35 ℃;进样量:40 μL。

2.1.2 溶液的制备 (1)对照品溶液。取盐酸小檗胺对照品约 10 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。(2)供试品溶液。取企业 C 样品,研细,混匀,精密称取 147.52 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(3)空白溶液。取处方成分较多的企业 C 的辅料,按处方比例制成空白溶液。

2.1.3 系统适用性试验 精密量取“2.1.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,盐酸小檗胺峰和相邻杂质峰的分离度大于 1.5。辅料对盐酸小檗胺的测定无干扰,理论板数以盐酸小檗胺峰计>3 000,色谱图详见图 1。

2.1.4 线性关系考察 取盐酸小檗胺对照品约 25 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成对照品溶液。精密量取上述对照品溶液 0.04、0.18、0.26、1.40、1.70、2.00、2.30、2.60 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,制成系列对照

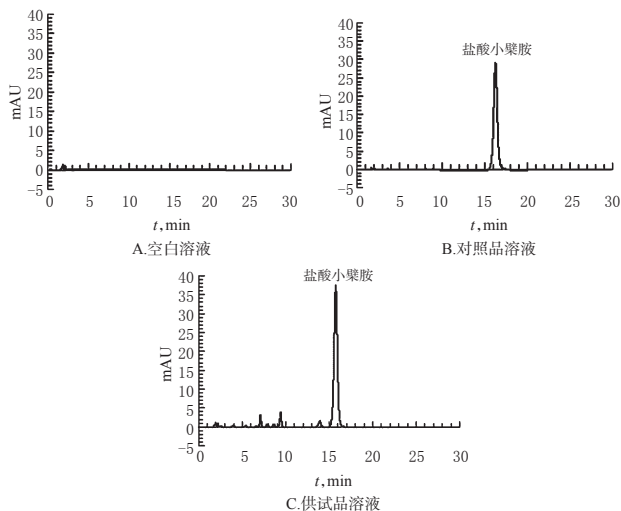


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 40 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以盐酸小檗胺质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=5\ 112.6x-1.118\ 9$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,盐酸小檗胺检测质量浓度线性范围为 3.96~257.40 μg/mL。

2.1.5 精密密度试验 取企业 A 供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,盐酸小檗胺峰面积的 RSD 为 0.10% ($n=6$),表明本方法的精密密度良好。

2.1.6 重复性试验 取按企业 A 提供的处方混匀的原料和辅料,约 65 mg,共 6 份,精密称定,分别置于 200 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密量取上述供试品溶液各 40 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,盐酸小檗胺的平均标示含量为 99.2% (RSD=0.67%, $n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.6”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0、1、2、4、8 h 时,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸小檗胺峰面积的 RSD 为 0.13% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内稳定性良好。

2.1.8 回收率试验 取企业 A 处方量辅料约 44 mg,置于 100 mL 量瓶中,共 9 份,分别按照 80%、100%、120% 的比例加入盐酸小檗胺原料适量,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密量取上述供试品溶液各 40 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果,样品平均回收率为 98.6% (RSD=1.64%, $n=9$),表明本方法准确度良好。

2.1.9 耐用性试验 取企业 A 45 min 溶出度样品一份,

分别采用 Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 按“2.1”项下方法测定溶出度。结果, 3 个品牌色谱柱测定的溶出度的 RSD 为 0.52% (n=3), 表明本方法耐用性良好。

2.2 溶出度测定装置的确定

浆法是片剂的首选溶出方法^[7], 且 5 家企业的盐酸小檗胺片在溶出介质中均无上浮现象, 故本研究采用浆法进行测定。

2.3 溶出度测定转速的确定

以水为溶出介质进行片剂溶出度测定, 转速分别选择 50、75 r/min, 按“2.1”项下方法操作。结果, 盐酸小檗胺片累积溶出度在 2 种转速下无明显差异, 以简单方便为原则, 故本研究选择转速为 50 r/min。

2.4 溶出介质的确定

2.4.1 溶出介质种类的确定 分别以水、pH 5.5 醋酸-醋酸钠缓冲液 (取醋酸钠 5.98 g, 加 2 mol/L 醋酸溶液 3 mL, 加水稀释至 600 mL) 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 [同 2015 年版《中国药典》(四部) 通则 8004 缓冲液]^[8] 为溶出介质, 分别于 0、5、10、15、20、30、45、60 min 取样 10 mL, 过滤, 同时补充等温同体积的溶出介质。取续滤液 40 μL, 测定, 计算累积溶出度, 绘制溶出曲线, 见图 2。

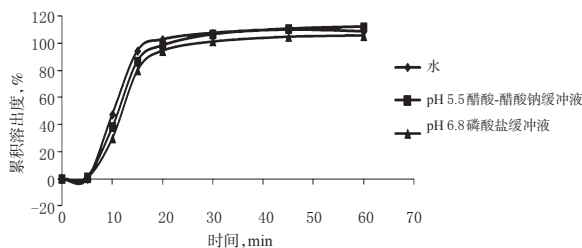


图2 样品在3种溶出介质中的累积溶出曲线

Fig 2 Accumulative dissolution curves of samples in 3 dissolution mediums

由图 2 可见, 盐酸小檗胺片在 3 种溶出介质中的溶出行为没有明显差异, 以简单方便为原则, 故本研究选择水为溶出介质。

2.4.2 溶出介质体积的确定 浆法溶出体积的范围一般为 500~1 000 mL。盐酸小檗胺的紫外吸收较弱, 为保证定量浓度的准确性, 故降低介质体积以提高待测浓度, 最终采用较常见的 600 mL 作为体积值。

2.5 溶出时间的确定

取各企业盐酸小檗胺片样品各 1 批, 每批 6 片, 分别放入溶出杯中, 以水 600 mL 为溶出介质, 转速为 50 r/min, 于 0、5、10、15、20、30、45、60 min 时取样 10 mL, 过滤, 同时补充等温同体积的溶出介质。取续滤液 40 μL 测定, 计算各时间点的累积溶出度, 绘制溶出曲线, 结果

见表 1、图 3。

表 1 5 家企业样品中盐酸小檗胺不同时间点的平均累积溶出度 (n=6, %)

Tab 1 Average accumulative dissolution of berbamine hydrochloride in samples from 5 enterprises at different time points (n=6, %)

时间, min	企业 A	企业 B	企业 C	企业 D	企业 E
0	0	0	0	0	0
5	30	0	0	46	0
10	67	48	0	82	12
15	87	95	0	93	51
20	96	103	4	94	87
30	98	108	31	95	103
45	97	110	81	96	107
60	97	109	104	96	108

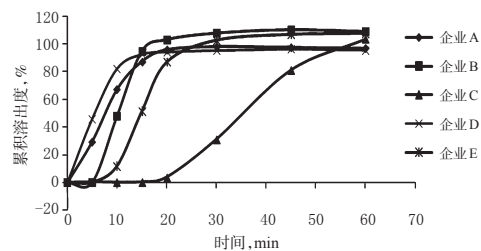


图3 5 家企业样品中盐酸小檗胺的累积溶出曲线

Fig 3 Accumulative dissolution curves of berbamine hydrochloride in samples from 5 enterprises

根据溶出行为, 取样时间应设定为溶出最大值减 5% 的时间。由表 1、图 3 可知, 除企业 C 外, 其余企业样品均在 45 min 以内达到溶出平衡, 故可设定溶出取样时间为 45 min。

2.6 溶出度限度的确定

5 家企业盐酸小檗胺片在达到溶出平衡时累积溶出度均大于 95%, 按累积溶出度最大值减 15% 确定为限度, 即限度为 80%。

2.7 批内均一性评价

按“2.5”项下操作, 选取每个生产企业各 1 个批号, 1 次试验 6 片, 以各点累积溶出度的精密度为指标, 比较批内均一性, 结果见图 4。

由图 4 可见, 企业 A 样品 5 min 时累积溶出度的 RSD 为 10% (应在 20% 以内), 10、15、20、30、45、60 min 累积溶出度的 RSD 分别为 8%、5%、4%、3%、4%、3% (各点应在 10% 以内), 均一性较好, 其余企业样品批内均一性均较差。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

现行盐酸小檗胺片的质量标准未控制溶出度, 而采用高氯酸非水滴定测定含量的方法易引入汞污染, 故笔者采用 HPLC 法测定溶出度, 并对方法进行验证。取盐

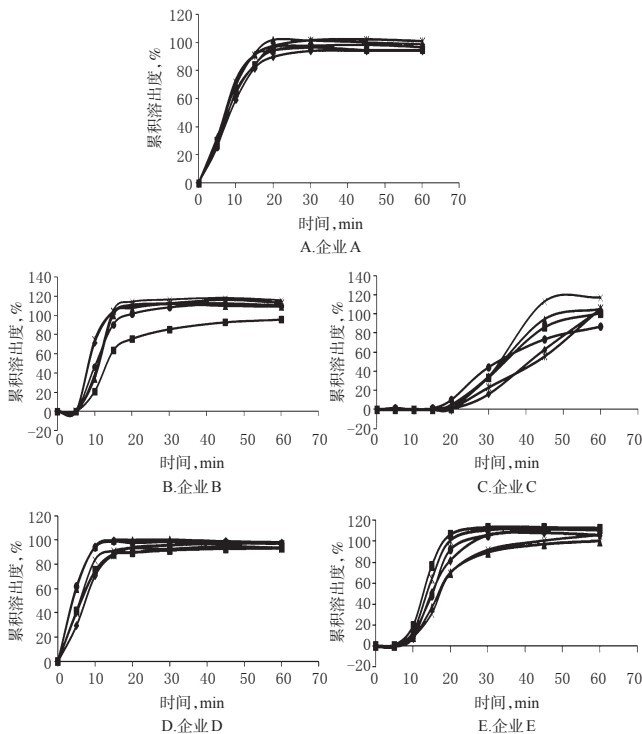


图4 5家企业盐酸小檗胺的批内均一性($n=6$)

Fig 4 Intra-batch uniformity of berbamine hydrochloride from 5 enterprises ($n=6$)

酸小檗胺对照品溶液,在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,结果盐酸小檗胺在282 nm波长处有最大吸收,故检测波长选定为282 nm。本文分别考察了盐酸小檗胺在乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液系统、乙腈-磷酸二氢钾溶液-离子对试剂系统和乙腈-磷酸氢二钾-三乙胺系统的色谱行为,结果后两者能满足色谱系统定量和分离度要求,考虑到离子对试剂对色谱柱的不可逆伤害,故最终选择乙腈-磷酸氢二钾-三乙胺系统作为该制剂的溶出度测定方法的流动相。

3.2 关于对照品的质量

中国食品药品检定研究院目前尚无法提供盐酸小檗胺国家对照品,鉴于试验要求,笔者采用了北京世纪奥科生物技术有限公司的对照品,其HPLC纯度 $\geq 98\%$ 。因对照品数量有限,笔者未对干燥失重、残留溶剂、炽灼残渣等进行进一步测定和标化,故按此纯度计算的溶出度结果可能存在2%~3%的偏差。该偏差对整体数据的影响是同向一致的,对溶出曲线的趋向的影响是可忽略的,故并不影响对整体结果的评价。

3.3 溶出介质的考察

本文在筛选溶出介质时,同时试验了该制剂在0.1 mol/L盐酸中的溶出情况。因样品直接进样(溶剂为0.1 mol/L盐酸)后与碱性流动相发生了中和反应,使得样品在液相色谱中的分析形态发生了变化,无法有效定量,故未绘制该介质中的溶出曲线。

3.4 结果分析

从5家企业盐酸小檗胺片的均一性曲线可知,除企业A外,其余各家样品均一性均较差,提示其余企业该制剂工艺尚有待提高。包糖衣的企业B、C和E 3家企业的该片剂溶出均有滞后现象,其中企业C的有效溶出开始时间约为20 min,即溶出较慢,可能会影响该药在体内的起效时间,且其溶出曲线记录至60 min时,仍未达到溶出平衡,该企业应对此关注。

3.5 研究意义

现行盐酸小檗胺片的质量标准尚不完善,对崩解时间进行检查无法评价小檗胺片的溶散速率和程度。前期调研显示,生产企业未对产品的工艺和辅料的来源等做深入研究,造成产品质量参差不齐。本文建立的溶出度方法可作为企业提升标准的参考,也可为该制剂质量标准的修订及企业产品质量的横向比较提供依据。

参考文献

- [1] 杜志茂,白娟,刘芳.盐酸小檗胺含量及有关物质的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2005,36(1):40-41.
- [2] 朱灿阳.小檗胺药理作用分析[J].中国热带医学,2005,5(1):109-110.
- [3] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升为国家标准:第十三册[S].2002:151-152.
- [4] 王茉莉,郭洁宁,郭毅,等.复方快诺酮片的溶出度测定方法研究及质量评价[J].中国药房,2016,27(12):1695-1698.
- [5] 李筱玲,刘敏,李美芳,等.愈酚维林片的溶出度测定方法研究[J].中国药房,2017,28(12):1702-1706.
- [6] 陈丽姣,杨冬霞,赵艳霞. HPLC法测定他米巴罗汀片的溶出度[J].中国药房,2016,27(30):4304-4306.
- [7] 谢沐风.如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J].中国医药工业杂志,2012,43(3):23-32.
- [8] 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,2015:325.

(收稿日期:2018-04-28 修回日期:2018-06-27)

(编辑:余庆华)