

腺苷钴胺片溶出度试验方法的建立

杨桂英*,董琨,官晓平,崔璐璐,陈佳琛(张家口市食品药品检验中心,河北张家口 075000)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2376-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.27

摘要 目的:建立腺苷钴胺片溶出度测定方法,并对4个企业的12批样品进行溶出度测定。方法:采用小杯法,以水200 ml为溶出介质,转速75 r/min,溶出取样点为30 min;采用高效液相色谱法检测含量,色谱柱为YMC C₁₈,流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH 3.2)-乙腈(85:15),检测波长为260 nm,进样量为50 μl。结果:腺苷钴胺检测质量浓度线性范围为0.257 5~1.545 0 μg/ml ($r=0.999 5$),平均回收率为99.2% ($n=3$)。不同取样时间点6片间及3批样品间溶出量的RSD均不超过9.3% ($n=6$);12批样品30 min时溶出量数据约为40%~97%。结论:各厂家样品溶出度结果差异较大,本方法具有区别腺苷钴胺片不同处方和生产工艺的能力,能有效控制该制剂的质量。

关键词 腺苷钴胺片;溶出度;高效液相色谱法

Establishment of the Method for Dissolution Test of Cobamamide Tablets

YANG Gui-ying, DONG Kun, GONG Xiao-ping, CUI Lu-lu, CHEN Jia-chen (Zhangjiakou Institute for Food and Drug Control, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for dissolution test of Cobamamide tablets, and to determine the dissolution of 12 batches of samples from 4 factories. METHODS: Small glass method was used with 200 ml water as medium at the rotation speed of 75 r/min. The dissolution time was 30 min. HPLC method was adopted, and the detection wavelength was set at 260 nm. The determination was performed on YMC C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH 3.2)-acetonitrile (85:15). The sample size was 50 μl. RESULTS: The linear range of cobamamide was 0.257 5-1.545 0 μg/ml ($r=0.999 5$) with an average recovery of 99.2% ($n=3$). RSD of dissolution curves of 6 tablets or 3 batches of samples were all lower than 9.3% ($n=6$) at the different time points. The dissolution of 12 batches of samples were 40%-97% within 30 min. CONCLUSIONS: The dissolution of samples from different manufacturers are different greatly. The method can identify different formulation and production process, and can be applied to control the quality of Cobamamide tablets.

KEYWORDS Cobamamide tablets; Dissolution; HPLC

取经离心后澄清的上清液,并且变取样量50 ml为25 ml,既节省了时间,使操作简便,又减小了光线、空气对维生素U的影响,使测定结果更准确、精密度高、重现性好。同时离心的方法不但可以解决样品吸附的问题,还可以降低检验成本。

(2) 氢氧化铝含量测定改进法的优点在于使操作变得简便,同时减小了二甲酚橙指示液的量,避免了二甲酚橙柠檬黄色因用量大色重而影响终点观察,使测定结果更加准确可靠、误差小。

(3) 氢氧化铝含量测定时所用指示液为二甲酚橙指示液,该指示液应临用新配^[2]。因为二甲酚橙从结构上看有1个可被氧化的酚羟基,在强烈的氧化作用下,其中的醌式结构也可被进一步氧化。其水溶液可被空气缓慢氧化,一般只能保持2~3周。

(4) 维U颠茄铝胶囊Ⅲ是复方制剂,由维生素U、氢氧化铝及颠茄浸膏组成,颠茄浸膏中含生物碱以硫酸阿托品计,但质量标准中无阿托品含量限度规定,建议国家食品药品监督管理局和国家药典委员会组织有关部门进行试验研究,增修订阿托品的鉴别及含量测定。

(5) 局颁国家药品标准中载有的维U颠茄铝胶囊^[4]是由维生素U(碘甲基蛋氨酸)、氢氧化铝、颠茄浸膏组成,是一种常用的抗胃溃疡药;载有的维U颠茄铝胶囊Ⅱ^[5]是由维生素U(碘甲基蛋氨酸)、氢氧化铝、颠茄提取物组成,是一种常用的胃肠黏

膜保护药,其中的维生素U及氢氧化铝含量测定均存在同样的问题,均可考虑采取同样的改进方法进行测定,并使维U颠茄铝胶囊、维U颠茄铝胶囊Ⅱ及维U颠茄铝胶囊Ⅲ的质控标准^[6-7]尽量一致,以确保药品质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准:第十五册:维U颠茄铝胶囊(Ⅲ)[S].2002:232.
- [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,2010:554、附录177、179-183.
- [3] 国家药典委员会.国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准:第七册:维生素U[S].2002:259.
- [4] 国家药典委员会.国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准:第六册:维U颠茄铝胶囊[S].2002:224-225.
- [5] 国家药典委员会.国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准:第十一册:维U颠茄铝胶囊(Ⅱ)[S].2002:57-58.
- [6] 王兰,张雁.关于维U颠茄铝胶囊(Ⅱ)质量标准的商榷[J].中国药品标准,2004,5(3):20.
- [7] 曹敏.维U颠茄铝胶囊含量测定方法的问题探讨[J].中国药事,2006,20(12):753.

(收稿日期:2013-12-20 修回日期:2014-02-11)

*高级工程师。研究方向:药物分析、药品质量标准研究。电话:0313-4061038-813。E-mail:ygy5901688@126.com

国家基本药物腺苷钴胺片收载于2010年版《中国药典》(二部)中^[1],为糖衣片,其在临床上主要用于巨幼红细胞贫血、妊娠期贫血、多发性神经炎、神经根炎、三叉神经痛、坐骨神经痛、神经麻痹的治疗,还可用于营养性疾患以及放射线和药物引起的白细胞减少症的辅助治疗^[2],是目前极具前景的周围神经病变治疗药物。但《中国药典》中未对其溶出度加以规定,文献也未见报道,按此标准检验得到的结果不能完全真实地反映药品的质量。药物溶出度试验更能体现药品的生物利用度,是口服固体制剂质量评价的重要指标,因而,药物的溶出行为也越来越被研究者所关注^[3]。为了更好地体现药品的生物利用度,提高药品质量标准,控制和评价腺苷钴胺片质量,笔者对腺苷钴胺片的溶出度测定方法进行了研究,建立了一个比较科学的溶出度测定方法,以有效地控制腺苷钴胺片的质量。

1 材料

e2695-2998型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司);LC-20AT型HPLC仪(日本岛津公司);RCZ-8M型智能试验溶出仪(天大天发科技有限公司)。

腺苷钴胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140658-200501,纯度:98.5%);腺苷钴胺片(国内企业A,批号:120502、131003、131004、131005;企业B,批号:035120301、035120402、035120403;企业C,批号:1111501、1112503、1112508;企业D,批号:120302、120303、120304。规格:均为每片0.25 mg)。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法学考察

2.1.1 色谱条件。色谱柱:YMC C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:以0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH为3.2)-乙腈(85:15),流速:1 ml/min;紫外检测器,检测波长:260 nm;柱温:35 ℃;进样量:50 μl。

2.1.2 溶液的制备。对照品溶液:精密称取经60 ℃减压干燥4 h的腺苷钴胺对照品适量,加水溶解,并用水稀释成每1 ml中约含1.25 μg的溶液,摇匀,即得。供试品溶液:取企业A样品(批号:120502),照溶出度测定法(2010年版《中国药典》二部附录XC第三法小杯法)^[1],以水200 ml为溶出介质,转速75 r/min,依法操作。经30 min时,取溶液10 ml,用微孔滤膜(0.45 μm)迅速滤过,取续滤液作为供试品溶液。

取上述2种溶液各50 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果腺苷钴胺的保留时间约为5.8 min,与相邻峰的分度大于1.5,理论板数约为8 000,详见图1。

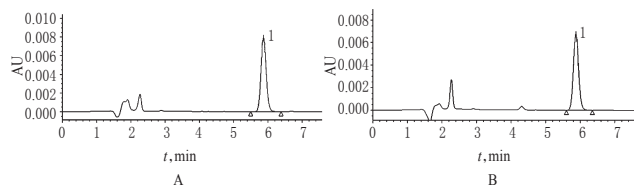


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 腺苷钴胺

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. sample; 1. cobamamide

2.1.3 线性关系试验。精密称取经60 ℃减压干燥4 h的腺苷钴胺对照品0.010 30 g,置于200 ml量瓶中,加水溶解后,用水稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液;精密量取1、2、3、4、

5、6 ml,分别置于200 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。在上述色谱条件下,分别量取50 μl,进样测定。以溶液的质量浓度(c)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,得线性方程为: $A=22\ 969c+1\ 310$ ($r=0.999\ 5, n=6$)。结果表明腺苷钴胺检测质量浓度线性范围为0.257 5~1.545 0 μg/ml。

2.1.4 精密度试验。取腺苷钴胺片30 min溶出液,连续进样6次,计算峰面积RSD为0.3%($n=6$)。

2.1.5 稳定性试验。取同一批号样品的溶液在室温避光放置8 h,每隔1 h进样1次,记录色谱峰面积,考察溶液的稳定性。结果,峰面积RSD为0.30%($n=9$),表明样品溶液在室温避光放置8 h内腺苷钴胺含量保持稳定。

2.1.6 回收率试验。取溶出度试验中已知准确质量浓度的供试品溶液9份,各10 ml,分别置于25 ml量瓶中,平均分成3组,分别加入10 μg/ml腺苷钴胺对照品溶液1.00、1.25、1.50 ml(分别相当于测定值的80%、100%、120%),用水定容,过0.45 μm滤膜,取续滤液进行测定,计算回收率。结果表明该方法的准确度较高,能够满足制剂分析的要求,详见表1。

表1 回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Result of recovery test($n=3$)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
10.00	10.08	100.8	99.2	1.0
	9.92	99.2		
	9.89	98.9		
12.50	12.32	98.6	99.2	0.5
	12.25	98.0		
	12.38	99.0		
15.00	15.15	101.1	99.6	1.3
	14.78	98.5		
	14.94	99.6		

2.2 溶出度测定

2.2.1 溶出度方法的选择。因本品中腺苷钴胺含量较低,在进行溶出度测定时考虑到含量测定方法的线性范围和检测灵敏度的要求,故采用溶出度测定法中的小杯法。

2.2.2 溶出介质的选择。取本品照溶出度测定法中的小杯法,依法进行测定,转速为75 r/min,溶出介质体积为200 ml。因腺苷钴胺在酸、碱环境中不稳定,故未考察其在pH 1.2酸溶液中的溶出。通过比较企业A样品(批号:120502)在200 ml的水、pH 4.5醋酸盐缓冲液、pH 6.8磷酸盐缓冲液中的溶出行为进行溶出介质的初步筛选。对同一批样品分别于10、15、20、30、45、60 min等时间点取样3 ml(同时补充同体积的溶出介质),并采用各时间点6片样品的平均溶出量为纵坐标、溶出时间为横坐标,绘制溶出曲线,详见图2。结果表明,本品在上述3种介质中的溶出行为基本一致,故选择水为溶出介质。

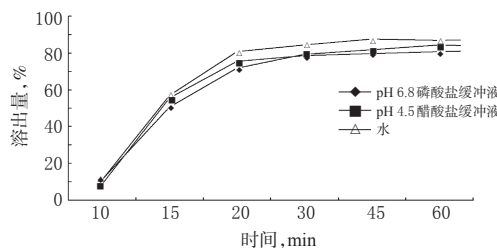


图2 样品在3种溶出介质中的溶出曲线

Fig 2 The dissolution curves of samples in 3 kinds of medium

2.2.3 转速的选择。取企业A样品(批号:120502)照溶出度测定法中的小杯法,依法进行测定。以水200 ml为溶出介质,转速首选50 r/min进行测定,结果溶出较慢,60 min时溶出量仅为75%,未达到85%的要求。改用75 r/min再次测定,溶出结果较为理想,故拟定转速为75 r/min。

2.2.4 溶出曲线的均一性与重现性试验。按照拟定的溶出度试验方法,对企业A 3批样品进行考察,以水200 ml为溶出介质,转速75 r/min,依法操作。分别于10、15、20、30、45、60 min时间点取样3 ml(同时补充同体积的溶出介质),用微孔滤膜(0.45 μm)迅速滤过,取续滤液50 μl 注入液相色谱仪测定,计算不同时间6片样品的平均溶出量。结果不同取样时间点6片间及3批样品间溶出量的RSD均不超过9.3%($n=6$),表明本法可以满足溶出度测定要求,详见表2、图3(注:表2中括号内数据为取样时间点6片间的RSD)。

表2 企业A 3批样品的溶出量结果

Tab 2 The dissolution amounts of 3 batches of samples from manufacturer A

时间, min	溶出量, %			RSD, %
	131003	131004	131005	
10	26.2(8.8%, $n=6$)	23.5(9.2%, $n=6$)	22.1(9.3%, $n=6$)	8.7
15	67.9(5.0%, $n=6$)	62.1(4.9%, $n=6$)	63.0(5.1%, $n=6$)	4.9
20	83.9(3.3%, $n=6$)	81.6(3.4%, $n=6$)	79.0(3.3%, $n=6$)	3.0
30	92.6(2.2%, $n=6$)	90.5(2.2%, $n=6$)	89.9(1.6%, $n=6$)	1.6
45	97.7(1.6%, $n=6$)	96.6(1.5%, $n=6$)	94.8(1.6%, $n=6$)	1.5
60	97.8(1.6%, $n=6$)	96.6(1.5%, $n=6$)	95.0(1.5%, $n=6$)	1.5

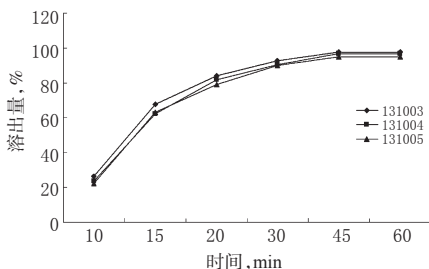


图3 3批样品的溶出曲线

Fig 3 The dissolution curves of 3 batches of samples

2.2.5 限度和溶出取样点的确定。根据溶出度测定要求,在溶出曲线中以第1次连续两点平均溶出量均在85%以上,且该两点溶出量平均值之差值在5%以内时,取第1时间点作为质量标准的取样时间点。根据表2及图3,可将30 min作为取样时间点,并将该点的溶出量减去15%作为溶出限度(即 Q 值),即91%~15%, Q 值应为76%。同时考察国内其他厂家样品,发现各厂家情况差异较大,对各厂家的情况进行对比后,采用了限度为70%。

2.2.6 样品溶出度的测定。按“2.1.2”项下方法制备溶液。取对照品和供试品2种溶液各50 μl ,注入色谱仪,记录色谱图,以外标法计算样品在30 min的溶出量。

按照拟定的溶出度测定方法对4个企业共计12批样品(企业A 120502批号样品未测)进行溶出度测定,结果见图4(每批样品分别取6片的溶出量平均值)。

从图4可以看出,企业A提供的3批样品溶出量均大于

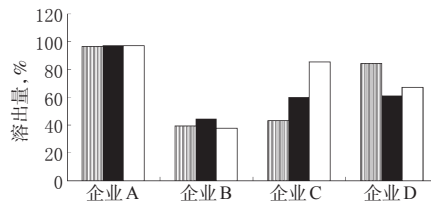


图4 不同厂家各3批样品的溶出度测定结果

Fig 4 The dissolution of 3 batches of samples from different manufacturers

70%, 12批样品30 min时溶出量数据约为40%~97%,各样品溶出度差异较大,表明本文拟定的溶出度试验方法具有区别不同处方和生产工艺的能力。

3 讨论

(1)腺苷钴胺片为糖衣片,本文采用HPLC法,色谱条件同2010年版《中国药典》(二部)腺苷钴胺片含量测定项,方便了样品的检测。

(2)腺苷钴胺片由于其结构的原因,对光极其敏感^[4],试验全过程必须避光。经考察,溶出度测定时若30 min内见光,结果含量会明显降低。后采取棕色溶出杯,实验室挂遮光帘,红色灯光避光操作,在此条件下考察样品溶液的稳定性,结果见“2.1.5”项,表明溶出试验过程避光操作可行。由于腺苷钴胺片规格为每片0.25 mg,在进行溶出度测定时采用了小杯法,通过对进样量的考察,20 μl 进样量响应值过低,故采用50 μl 的进样量,结果精密度良好。通过对溶出介质和转速进行考察,根据介质首先选用水的原则,确定以水200 ml为溶出介质、转速为75 r/min,相应的方法学验证均符合要求。

(3)为考察滤膜的吸附作用,笔者取溶出液分别经过高速离心(4 000 r/min,离心半径5.5 cm,5 min)及0.45 μm 的微孔滤膜过滤弃去1、2、3、4、5 ml后取续滤液作为供试品溶液,结果溶出液过滤弃去2 ml后与高速离心溶液相比,计算峰面积RSD=0.31%($n=6$),表明弃去初滤液2 ml后取续滤液进行测定,不会对主药有吸附作用。

(4)按建立的溶出度方法测定,企业A提供的3批样品测定结果均大于70%,其他厂家的样品溶出结果之间差距较大,由此可见,上述拟定的溶出度试验方法具有区别不同处方和生产工艺的能力,从而为生产处方的合理性、生产工艺的稳定性的考察均提供了良好的监控手段,能有效控制产品的质量。

参考文献

- [1] 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: 1 086、附录85.
- [2] 王志良, 冷健, 崔红燕. 腺苷钴胺的临床应用进展[J]. 中国药事, 2006, 20(2): 122.
- [3] 姜建国, 张西如, 宋更申, 等. 枸橼酸喷托维林制剂的溶出度试验方法的建立及42厂家药品考察[J]. 中国药房, 2013, 24(17): 1 593.
- [4] 罗丽萍, 雷嘉川. 腺苷钴胺水溶液的光降解动力学研究[J]. 中国药师, 2010, 13(8): 1 104.

(收稿日期: 2014-01-10 修回日期: 2014-03-12)