

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)18-0081-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.18.017



复方芦丁片溶出度测定方法的建立及应用*

屈晓萍, 屠相土, 李俊[△]

(浙江省台州市药品检验研究院, 浙江 台州 318000)

摘要:目的 建立复方芦丁片溶出度的测定方法,并以此评价国内市售产品的质量。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱为 PolyPak C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为磷酸盐缓冲液(pH 3.0) - 甲醇(55:45, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 259 nm,柱温为 30 °C,进样量为 20 μL。以累积溶出度为考察指标,采用单因素试验优选转速、十二烷基二甲基氧化胺(LDAO)溶液体积分数,并考察取样时间和管路吸附对其的影响。结果 芦丁质量浓度在 1.103~33.090 μg/mL ($r=0.9999, n=8$) 范围内与峰面积线性关系良好;定量限为 0.180 μg/mL,检测限为 0.055 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0%;平均加样回收率为 100.70%, RSD 为 1.76% ($n=9$);样品以 0.5% LDAO 溶液(900 mL)为溶出介质、转速为 75 r/min,在 45 min 时取样可得较好累积溶出度。5 家企业 27 批样品的溶出度,1 家有 2 批在 70%~75% 之间,1 家各批均低于 70%。结论 所建立的方法专属性强,精密性、稳定性、重复性和准确度好,能反映国内不同企业所产复方芦丁片的质量差异。

关键词: 复方芦丁片; 高效液相色谱法; 溶出度; 质量评价

Establishment and Application of a Dissolution Determination Method for Compound Rutin Tablets

QU Xiaoping, TU Xiangtu, LI Jun

(Zhejiang Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou, Zhejiang, China 318000)

Abstract: Objective To establish a method for determining the dissolution of Compound Rutin Tablets, and on this basis, to evaluate the quality of commercial products in China. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was adopted, the chromatographic column was PolyPak C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was phosphate buffer (pH 3.0) - methanol (55:45, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 259 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. With the cumulative dissolution as the evaluation index, the rotational speed and volume fraction of lauryl dimethylamine oxide (LDAO) solution were optimized by the single factor test, and the effects of sampling time and pipeline adsorption on the cumulative dissolution were investigated. **Results** The linear range of rutin was 1.103 - 33.090 μg/mL ($r=0.9999, n=8$). The limit of quantification was 0.180 μg/mL, and the limit of detection was 0.055 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 1.0%. The average recovery rate of rutin was 100.70% with an RSD of 1.76% ($n=9$). The optimal dissolution determination method was as follows: 0.5% LDAO solution (900 mL) was as the dissolution medium, the rotational speed was 75 r/min, and the sampling time was 45 min. Among the 27 batches of samples (five enterprises), the dissolution of two batches (one enterprise) was in the range of 70% to 75%, while that of all batches (another enterprise) was below 70%. **Conclusion** The established method is specific, precise, stable, repeatable and accurate, which can display the quality differences of Compound Rutin Tablets produced by different enterprises in China.

Key words: Compound Rutin Tablets; HPLC; dissolution; quality evaluation

复方芦丁片是由芦丁(20 mg)、维生素 C(50 mg)组成的复方制剂,主要用于治疗脆性增加的毛细血管出血症,也作为高血压脑病、脑出血、视网膜出血、出血性紫癜、急性出血性肾炎、再发性鼻出血、创伤性肺出血、产后出血等的辅助治疗处方药^[1-5]。复方芦丁片收载于《卫生部药品标准·化学药品及制剂(第一册)》(WS₁-68(B)-89),标准中无溶出度检查项,不能客观地反映主药的溶出速率和溶出程度,且处方中芦丁的水溶性

差,故有必要进行溶出度考察。本研究中拟建立复方芦丁片溶出度的测定方法,并以此考察国内市售产品质量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 708DS 型溶出度仪(配备 850-DS 取样收集系统), Agilent 1260 型高效液相色谱仪(配备 DAD 检测器和 Chemstation 色谱工作站),均购自美国 Agilent 公

* 基金项目:浙江省台州市社会发展类科技计划项目[22ywb90]。

第一作者:屈晓萍,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品检测与质量控制,(电子信箱)wateringsun@163.com。

[△]通信作者:李俊,男,硕士,主任药师,研究方向为药物分析与质量控制,(电话)0576-89026977(电子信箱)82206955@qq.com。

司;CPA225D型电子天平(赛多利斯<北京>有限公司,精度0.01 mg);SK5200HP型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

27批复方芦丁片样品为2021年浙江省各地区的抽样样品(企业a,批号分别为20200530,20200531,20200921,20200922,20201121,20201122,20210112,20210113,20210414;企业b,批号分别为191103,200502,200503,200505,200701,200702,200703,200704,200706,210403;企业c,批号分别为1909N01,2001N09,2004N23,2008N04;企业d,批号分别为181201,210102;企业e,批号分别为2002002,2004002,规格均为每片含维生素C 50 mg、芦丁20 mg);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100080-202012,含量91.6%);十二烷基二甲基氧化胺(LDAO,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为B1911095,含量35%);甲醇为色谱纯,二水磷酸二氢钠为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:PolyPak C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:磷酸盐缓冲溶液(pH 3.0) - 甲醇(55:45, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:259 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液:取芦丁对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成质量浓度为0.44 mg/mL的溶液A,精密量取25 mL,置50 mL容量瓶中,加0.5%LDAO溶液定容,得溶液B,精密量取5 mL,置50 mL容量瓶中,加0.5%LDAO溶液稀释并定容,摇匀,即得芦丁质量浓度

为22 μg/mL的对照品溶液。

供试品溶液:取样品细粉适量(相当于芦丁11 mg),精密称定,置500 mL容量瓶中,加少量甲醇,超声(200 W、53 kHz,下同)处理10 min,加0.5%LDAO溶液约300 mL,于热水中加热10 min,不断振摇,使芦丁完全溶解,冷却,加0.5%LDAO定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

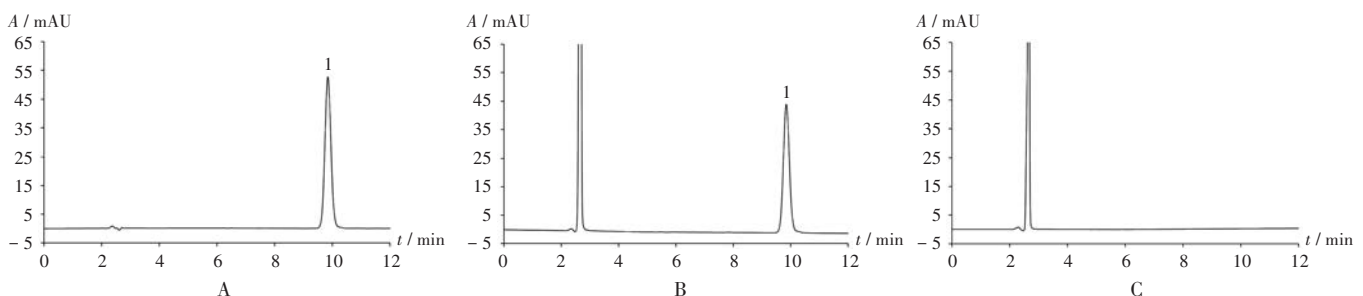
阴性对照品溶液:按复方芦丁片处方和工艺制备缺芦丁的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.1.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按芦丁峰计为10 125,分离度均大于1.5,基线分离良好。阴性对照无干扰峰。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.1.2项下溶液B适量,各置50 mL容量瓶中,加0.5%LDAO溶液稀释,制成质量浓度分别为1.103, 2.206, 4.412, 11.03, 17.65, 22.06, 26.47, 33.09 μg/mL的系列对照品溶液。取适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以芦丁质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 35.752 2X - 0.173 1$ ($r = 0.999 9, n = 8$)。结果表明,芦丁质量浓度在1.103 ~ 33.090 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察:取2.1.2项下对照品溶液适量,加0.5%LDAO溶液倍比稀释,并按2.1.1项下色谱条件进样测定,以信噪比为10:1、3:1时的进样量分别记作定量限、检测限。结果芦丁的定量限及检测限分别为0.180 μg/mL及0.055 μg/mL。



1. 芦丁

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Rutin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

精密度试验:取2.1.2项下对照品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果芦丁峰面积的RSD为0.71%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.1.2项下供试品溶液(批号为20200530)适量,分别于室温下放置0,2,4,6,8,10,12,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芦丁峰面积的RSD为0.27%($n=8$),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20200530)适量,精密称定,各6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果芦丁平均含量为93.25%,RSD为0.46%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20200530)适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的芦丁对照品溶液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=9$)

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

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
4.060	1.103	5.130	97.00		
4.165	1.103	5.286	101.63		
4.062	1.103	5.194	102.63		
4.074	4.412	8.575	102.02		
4.028	4.412	8.405	99.21	100.70	1.76
4.040	4.412	8.498	101.04		
4.042	6.618	10.643	99.74		
4.074	6.618	10.826	102.02		
4.040	6.618	10.725	101.01		

2.2 溶出方法确定

2.2.1 转速确定

取样品(批号为20200530)适量,以0.6%LDAO溶液(900 mL)作为溶出介质,转速为50,75 r/min,在5,10,15,20,30,45,60,90,120 min时分别取样,滤过,取续滤液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量,并绘制溶出曲线(图2),同时补充等量的溶出介质。结果显示,50 r/min条件下,30 min时芦丁仅溶出约60%,120 min时仍未到达平台期;75 r/min条件下,30 min时的累积溶出度比前者约高30%,到45 min时已达平台期,故选择转速为75 r/min。

2.2.2 溶出介质体积分数确定

根据溶解度试验结果,不同浓度LDAO溶液,芦丁

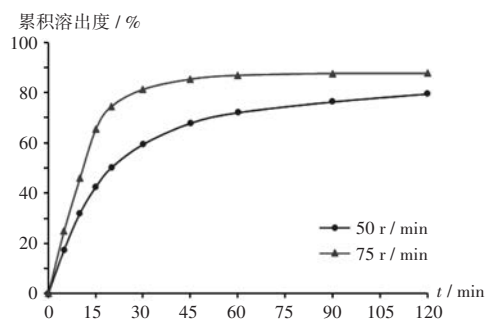


图2 不同转速条件下的溶出曲线

Fig.2 Dissolution profiles of samples at different rotational speed

溶解度及溶出情况均可能不同,参照《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》(简称《原则》)推荐的表面活性剂浓度,取复方芦丁片样品(批号为20200530)适量,分别以0.3%,0.4%,0.5%,0.6% LD-AO溶液900 mL作为溶出介质,转速为75 r/min,在5,10,15,20,30,45,60,90,120 min时分别取样,滤过,取续滤液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量,并绘制溶出曲线(图3),同时补充等量的溶出介质。结果显示,样品在0.3%LDAO溶液中溶出较慢,在0.4%LDAO溶液中有所增加,而在0.5%和0.6%LDAO溶液中的溶出情况基本一致,为尽可能接近生理环境,减少表面活性剂的浓度,故溶出介质选择0.5%LDAO溶液。

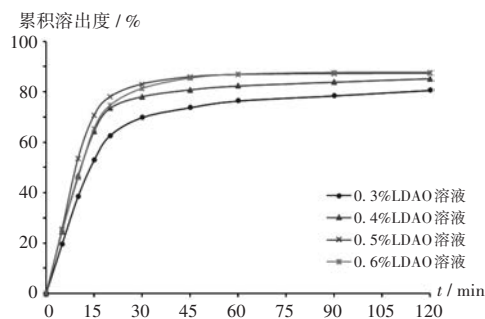


图3 不同溶出介质条件下的溶出曲线

Fig.3 Dissolution profiles of samples in different mediums

2.2.3 取样时间确定

选择溶出曲线中累积溶出度不低于85%且差值小于5%的前2个时间点,取前一时间点为取样时间点,并将其累积溶出度减去15%作为溶出限^[6]。2.2.2项下溶出曲线中2个时间点分别为45 min和60 min,故取样时间选择45 min。

2.2.4 管路吸附考察

以0.5%LDAO溶液为溶出介质,转速为75 r/min时,溶出试验最后一个取样点取样后,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别采用手动取样和取样系统自动取样,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果手动取样和仪器自动取样得到的峰面积一致,表明溶

出仪和取样系统的管路对芦丁均无吸附。

2.3 样品溶出度考察

取5家生产企业的7批样品各适量,以0.5%LDAO溶液(900 mL)为溶出介质,转速为75 r/min,在45 min时取样,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量,并绘制溶出曲线(图4)。5个企业的27批样品中,厂家a、d、e的所有批次样品的平均溶出度均高于75%;厂家b的10批样品中有8批平均溶出量高于75%,有2批的溶出度在70%~75%之间,且6片中均有2片低于65%;厂家c的4批样品平均溶出度均低于70%。

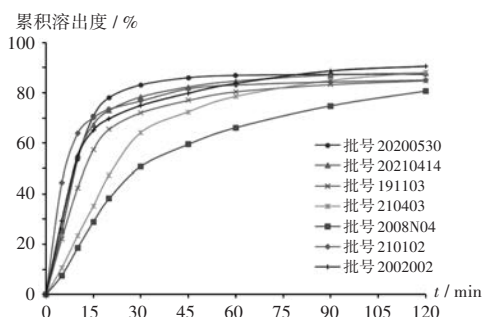


图4 不同样品的溶出曲线($n=12$)

Fig. 4 Dissolution profiles of different samples ($n=12$)

3 讨论

3.1 芦丁测定方法

复方芦丁片现行质量标准中测定芦丁含量采用紫外-可见分光光度法,预试验中发现样品中的杂质含量较高,且在362.5 nm波长处均有较强吸收,故建立HPLC法测定芦丁含量,并用于溶出度的测定。结果显示,辅料和杂质对样品均无干扰,方法准确可靠,满足样品溶出度测定的要求。

3.2 溶出介质

预试验中,芦丁在水及pH 1.2, 4.0, 6.8的缓冲液中溶解度较低。有文献显示,芦丁在碱性溶液中的溶解度较高^[7];且随着水溶液的碱性增强芦丁的溶出度会增大^[8],故采用pH 8.0磷酸盐缓冲液作为溶出介质。《原则》要求,采用pH > 7.5溶出介质试验时应提供充分依据,否则一般不建议采用,且该文献未考察不同厂家不同批次样品,故本研究中未采用该方法,而是尝试采用加入表面活性剂的溶液作为溶出介质。

复方芦丁片每片含芦丁20 mg,若溶出介质体积为1 000 mL,完全溶解时的质量浓度为20 μg/mL,要满足溶出的漏槽条件^[9],芦丁的溶解度需不低于100 μg/mL。根据芦丁的溶解度试验结果,芦丁在pH 1.2, 4.0, 6.8的缓冲液、水及不同浓度吐温中的溶解度均低于该值,均未达到漏槽条件;在0.2%SDS溶液中的溶解度可达

111.9 μg/mL,但随着SDS体积分数的增加,芦丁的溶解度增加不明显,在0.8%SDS溶液中的溶解度仅为361.3 μg/mL;添加LDAO能明显提高芦丁的溶解度,0.5%LDAO溶液即能使芦丁的溶解度达到1 425.6 μg/mL。故本研究中选择含LDAO的溶液作为溶出介质。

3.3 原因分析

根据样品溶出曲线结果,可知5家生产企业样品的溶出曲线走势不完全相同,即采用建立的溶出方法可反映不同生产企业产品之间的溶出行为的差异。对本研究中6批次样品溶出度结果较差的原因进行分析可知,企业c与企业a、企业d的处方中的辅料种类基本相同,前者仅处方中糊精的用量是后两者的2倍以上,具有黏合作用的糊精用量过多会导致崩解变慢,水溶性欠佳的芦丁因被包裹释放较慢,故溶出度结果较差,制粒、整粒、压片等工艺也可能影响样品的溶出^[10-11];企业b的10批样品中有2批次溶出度结果较差,原因可能与混合、总混等工艺不稳定有关,说明该企业生产工艺的稳定性仍有待提高。

综上所述,本研究所建立的方法专属性强,精密度、稳定性、重复性和准确度好,能反映国内不同企业复方芦丁片的质量差异。

参考文献

- [1] 段芙蓉. 复方芦丁片联合欣母沛治疗产后出血的临床疗效观察[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(12): 7-8.
- [2] 陈业星. 益母草注射液联合复方芦丁片治疗产后出血的临床效果[J]. 实用妇科内分泌电子杂志, 2017, 4(2): 117.
- [3] 陈娟, 夏少玉. 复方芦丁片联合米索前列醇片治疗产后出血的效果[J]. 中国社区医师, 2022, 38(18): 16-18.
- [4] 赵晔, 汤卫红, 朱玉霞. 复方芦丁片联合泮托拉唑治疗过敏性紫癜效果分析[J]. 现代实用医学, 2020, 32(8): 966-967.
- [5] 任继刚, 周琳, 赵大林. 复方芦丁片对冠心病患者抗血小板药物所致皮下出血的影响[J]. 中国医药指南, 2009, 7(19): 83-84.
- [6] 谢沐风. 如何科学、客观地制定溶出度试验质量标准[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(3): 243-252.
- [7] 钟玲, 臧志和, 鲁朝江. 芦丁溶解度及油水分配系数研究[J]. 中国药业, 2009, 18(19): 10-12.
- [8] 张平, 陈睿, 王彦, 等. 复方芦丁片溶出度方法的研究[J]. 药学服务与研究, 2016, 16(3): 225-229.
- [9] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 474.
- [10] 刘超, 宗剑飞. 影响片剂溶出度的因素分析[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(3): 252-257.
- [11] 李芳美. 影响片剂溶出度的因素探讨[J]. 广东药学, 2005, 15(5): 19-21.

(收稿日期: 2022-11-15; 修回日期: 2023-04-16)