

HPLC法测定比沙可啶肠溶片的含量及含量均匀度

张西如*, 孙 婷, 姜建国, 郭永辉, 张轶华(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2573-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.42

摘要 目的:建立测定比沙可啶肠溶片含量及含量均匀度的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX C₁₈,流动相为乙腈-20 mmol/L 乙酸铵溶液(冰醋酸调pH至5.0)(55:45, V/V),检测波长为265 nm,柱温为30 ℃,流速为1.0 ml/min,进样量为20 μl。结果:比沙可啶检测质量浓度线性范围为50~1 000 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;回收率为99.50%~101.17%,RSD=0.5%($n=9$)。结论:该方法重复性好、准确度高,适用于比沙可啶肠溶片的质量控制。

关键词 高效液相色谱法;比沙可啶肠溶片;含量;含量均匀度

Determination of Content and Content Uniformity of Bisacodyl Enteric-coated Tablet by HPLC

ZHANG Xiru, SUN Ting, JIANG Jianguo, GUO Yonghui, ZHANG Yihua(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of content and content uniformity in Bisacodyl enteric-coated tablet. METHODS: HPLC method was performed on the column of Agilent ZORBAX C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-20 mmol/L ammonium acetate (adjusted pH to 5.0 with acetic acid) (55:45, V/V), the detection wavelength was 265 nm, column temperature was 30 ℃, flow rate was 1.0 ml/min, and the volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range of bisacodyl was 50-1 000 μg/ml($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 99.50%-101.17% (RSD=0.5%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is reproducible with high accuracy, and suitable for the quality control of Bisacodyl enteric-coated tablet.

KEYWORDS HPLC; Bisacodyl enteric-coated tablets; Content; Content uniformity

比沙可啶是国外20世纪50年代末上市的优良缓泻药,化学名称为4,4'-(2-吡啶亚甲基)-二苯酚醋酸酯,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,促进排便。其肠溶片剂属于甲类非处方药(OTC),现行质量标准收载于《中国药典》2015年版(二部)^[1],相关标准采用紫外分光光度法测定其含量及含量均匀度。该方法易受包衣辅料影响,检验结果偏高,准确度低、精密性差。因此,本试验拟采用高效液相色谱(HPLC)法测定比沙可啶肠溶片的含量及含量均匀度。本方法重复性好,准确度高,有利于提高该制剂的质量评价与控制,对于控制该制剂的生产和贮存期质量有实际意义。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括1260型紫外检测器、EZChrom工作站(美国Agilent公司);XS105型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);SB-5200DT型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

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);比沙可啶肠溶片(A公司,批号:30901、12053、11092,规格:5 mg;B公司,批号:10102、12306、13009,规格: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);冰醋酸(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:Agilent ZORBAX C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相:乙腈-20 mmol/L 乙酸铵溶液(冰醋酸调pH至5.0)(55:45, V/V);检测波长:265 nm;柱温:30 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液 精密称取比沙可啶对照品50 mg,置于50 ml量瓶中,加冰醋酸-乙腈-水(4:30:66, V/V/V)混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液 取“2.2.1”项下对照品贮备液1 ml,以“2.2.1”项下混合溶剂定量稀释制成每1 ml中含约0.2 mg的溶液,即得。

2.2.3 含量测定用供试品溶液 取样品20片,除去包衣,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于比沙可啶10 mg),置于50 ml量瓶中,加“2.2.1”项下混合溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 含量均匀度测定用供试品溶液 取样品1片,除去包衣,精密称定,研细,置于25 ml量瓶中,加“2.2.1”项下混合溶剂适量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)使比沙可啶溶解,再用上述混合溶剂稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得(同法操作10片)。

2.2.5 空白辅料溶液 精密称取生产企业处方中包含的所有辅料适量,按“2.2.3”项下方法进行操作,制成空白辅料溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下对照品溶液、含量测定用供试品溶液、空白辅料溶液各适量,分别按“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,在该色谱条件下,待测成分峰与溶剂及其他杂质峰分离良好;比沙可啶峰保留时间约为12 min,理论板数按比沙可啶峰计≥3 000,拖尾因子≤1.5。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液0.5、1.0、1.5、2.0、

*主任药师。研究方向:药物分析。电话:0311-85212009

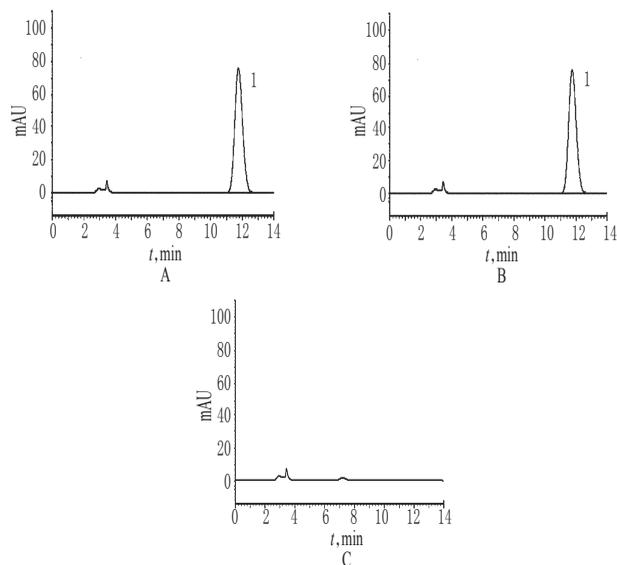


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 含量测定用供试品; C. 空白辅料; 1. 比沙可啶

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample for content determination; C. blank excipient; 1. bisacodyl

5.0、10.0 ml, 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, 各精密量取 20 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以比沙可啶质量浓度(x , μ g/ml)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y = 3.06 \times 10^5 x - 0.456$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 比沙可啶检测质量浓度线性范围为 50~1 000 μ g/ml。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 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, 记录峰面积, 按信噪比为 3:1 计算得到检测限, 按信噪比为 10:1 计算得到定量限。结果, 比沙可啶的检测限、定量限分别为 20、67 ng。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液 20 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样连续测定 6 次, 记录峰面积。结果, 比沙可啶峰面积的 RSD=0.3% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下含量测定用供试品溶液适量, 在室温条件下放置 0、1、2、4、6、8、12 h 时分别精密量取 20 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 比沙可啶峰面积的 RSD=0.3% ($n=7$), 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号: 30901)适量, 共 6 份, 分别按“2.2.3”项下方法制备含量测定用供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算含量。结果, 比沙可啶含量的 RSD=0.5% ($n=6$), 表明本方法重复性较好。

2.9 回收率试验

按处方量取空白辅料 9 份, 分别置于 50 ml 量瓶中, 每 3 份精密加入相当于样品所含比沙可啶量 80%、100%、120% 的对照品各适量, 按“2.2.3”项下方法制备含量测定用供试品溶液, 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 样品含量测定

取 6 批样品及比沙可啶对照品各适量, 分别按“2.2”项下方法制备含量测定用供试品溶液和对照品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外标法以峰面积计算含

量。结果, A 公司 3 批(批号: 30901、12053、11092)样品含量分别为 99.2%、95.7%、94.8% ($n=2$); B 公司 3 批(批号: 10102、12306、13009)样品含量分别为 95.7%、96.4%、96.5% ($n=2$)。

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, %
8.02	7.98	99.50		
7.95	7.97	100.25		
7.99	8.01	100.38		
9.97	10.01	100.40		
9.87	9.90	100.30	100.4	0.5
9.85	9.94	100.91		
11.95	12.02	100.58		
11.97	12.03	100.50		
11.91	12.05	101.17		

2.11 样品含量均匀度测定

取 6 批样品及比沙可啶对照品各适量, 分别按“2.2”项下方法制备含量均匀度测定用供试品溶液和对照品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外标法以峰面积计算含量, 平行测定 10 片, 通过含量均匀度公式 $A + 2.2S \leq 15.0$ (A : 标示量与均值之差的绝对值; S : 标准差) 来判定其含量均匀度是否符合要求, 结果见表 2。

表 2 样品含量均匀度测定结果 ($n=10$)

Tab 2 Determination results of content uniformity of samples ($n=10$)

批号	平均含量, %	A	S	$A+2.2S$
30901	101.3	1.3	2.5	6.8
12053	97.6	2.4	1.9	6.6
11092	95.7	4.3	2.1	8.9
10102	97.1	2.9	5.2	14.3
12306	98.2	1.8	2.3	6.9
13009	96.9	3.1	0.7	4.6

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器测得比沙可啶在 265 nm 波长处有最大吸收, 辅料在此波长处则无吸收, 故选择最大吸收波长 265 nm 作为本试验的检测波长。

3.2 固定相的选择

《美国药典》37 版收载的比沙可啶栓剂含量测定采用 HPLC 法, 选用的色谱柱填料为十八烷基硅烷键合硅胶(L1 色谱柱)和 30~50 μ m 表面多孔薄壳型键合 C_{18} (ODS) 固定相的保护柱(L2 保护柱)。《英国药典》2014 版收载的比沙可啶原料药有关物质检查采用 HPLC 法, 选用带封端的十八烷基硅烷键合硅胶柱。笔者分别以 Hibar RP-18 Endcapped(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent ZORBAX C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Waters XTerra[®] MS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Waters Symmetry Shield[™] RP18(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)、Diamonsil[™] C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 5 根不同厂家、不同填料、不同柱长的 C_{18} 色谱柱进行试验, 发现均可对样品进行有效分离, 最终选择 Agilent ZORBAX C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 为本试验色谱柱。

3.3 流动相缓冲盐的选择

笔者参考相关文献^[2-4], 将流动相缓冲盐采用更为常用的乙酸铵, 且加入适量冰醋酸调节 pH 至 5.0, 使色谱系统稳定性更好。方法学验证结果表明, 该流动相系统的准确度、精密度、专属性、线性、耐用性均良好。

参考文献

不同品种、产地和种植方式黄芪药材中黄酮类成分的质量分析

周 鹏^{1*}, 胡明勋^{1,2}, 李浩飞², 王秋冬²(1.河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2.平煤神马医疗集团总医院, 河南平顶山 467000)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2575-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.43

摘要 目的:建立同时测定黄芪药材中黄酮类成分含量的方法,探讨黄芪药材中黄酮类成分与品种、产地和种植方式的关系。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil ASB,流动相为乙腈-0.3%甲酸(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 260 nm,柱温为 25 ℃。比较多省份 28 批野生和栽培的蒙古黄芪和膜荚黄芪的药材质量。结果:毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮和芒柄花素检测质量浓度线性范围分别为 0.008 9~2.224 mg/ml($r=0.999\ 5$)、0.005 2~1.3 mg/ml($r=0.999\ 6$)、0.002 8~0.697 6 mg/ml($r=0.999\ 9$)、0.002~0.5 mg/ml($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<1%;加样回收率分别为 99.52%~100.74% (RSD=0.41%, $n=6$)、98.84%~100.60% (RSD=0.60%, $n=6$)、98.47%~101.74% (RSD=1.08%, $n=6$)、100.10%~101.59% (RSD=0.32%, $n=6$)。从品种分析,蒙古黄芪药材中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、总黄酮的含量要高于膜荚黄芪,但毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量少于膜荚黄芪;从产地分析,内蒙古、山西产黄芪药材中毛蕊异黄酮苷、总黄酮的含量最高,东北、甘肃次之,山东、安徽、陕西较低;从种植方式分析,野生黄芪药材中毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、总黄酮的含量高于栽培品种,栽培黄芪药材中毛蕊异黄酮、芒柄花素含量高于野生品种。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于黄芪药材中黄酮类成分含量的同时测定。不同产地黄芪药材中 4 种黄酮类成分含量差异大,药材的品种、产地和种植方式是影响黄芪质量的主要因素。

关键词 黄芪;毛蕊异黄酮苷;芒柄花苷;毛蕊异黄酮;芒柄花素;高效液相色谱法

Quality Analysis of Flavonoids in Astragali Radix from Different Variety, Origins and Planting Mode

ZHOU Peng¹, HU Mingxun^{1,2}, LI Haofei², WANG Qiudong²(1.The First Affiliated Hospital of Henan Traditional Medicine University, Zhengzhou 450000, China; 2.General Hospital of Pingmei Shenma Group, Henan Pingdingshan 467000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of flavonoids components in Astragali Radix, and to explore the relationship among flavonoids components, varieties, origins and planting patterns. METHODS: HPLC was performed on the column of Venusil ASB with mobile phase of acetonitrile-0.3% formic acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 260 nm, and column temperature was 25 ℃. Medicinal material quality of Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao and A. membranaceus (Fisch.) Bge of wild and cultivated from different province was compared. RESULTS: The linear range of the mass concentration was 0.008 9-2.224 mg/ml for calycosin glucoside ($r=0.999\ 5$), 0.005 2-1.3 mg/ml for ononin ($r=0.999\ 6$), 0.002 8-0.697 6 mg/ml for calycosin ($r=0.999\ 9$) and 0.002-0.5 mg/ml for formononetin ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recoveries were 99.52%-100.74% (RSD=0.41%, $n=6$) for calycosin glucoside, 98.84%-100.60% (RSD=0.60%, $n=6$) for ononin, 98.47%-101.74% (RSD=1.08%, $n=6$) for calycosin, 100.10%-101.59% (RSD=0.32%, $n=6$) for formononetin. In terms of varieties, the contents of calycosin glycosides, ononin and flavonoids in A. membranaceus (Fisch.) Bge. var. mongholicus (Bge.) Hsiao were higher than those of A. membranaceus (Fisch.) Bge, but the contents of calycosin and formononetin were less than those of A. membranaceus (Fisch.) Bge; in terms of origins, calycosin glycosides and flavonoids of Inner Mongolia and Shanxi held the highest contents, followed by those of Northeast China and Gansu, and lowest in Shandong, Anhui and Shaanxi; in terms of planting patterns, the contents of calycosin glycosides, ononin and flavonoids of wild Astragali Radix were higher than those of cultivated varieties, and the contents of calycosin and formononetin of cultivated varieties were higher than those of wild ones. CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of flavonoids components in Astragali Radix. The flavonoids components show great differences in Astragali Radix from different origins, and they are affected by varieties, origins and planting patterns.

KEYWORDS Astragali Radix; Calycosin glycoside; Ononin; Calycosin; Formononetin; HPLC

[1] 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: 74.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 黄孝闻, 陈平华, 陈莉君, 等. HPLC 法测定水溶性红曲中 MonacolinK 的含量[J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(9): 685.

(收稿日期: 2015-07-25 修回日期: 2016-05-13)

(编辑: 周 簪)

* 副主任药师。研究方向: 临床药理学和药动学。电话: 0371-62895049。E-mail: 15890617667@139.com