

两种熊去氧胆酸软胶囊主药含量测定方法的比较

隋玉荣^{1*}, 丁一², 黄哲甦¹(1.天津市药品检验所, 天津 300070; 2.天津药物研究院, 天津 300193)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)24-2287-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.24.27

摘要 目的:建立和优选测定熊去氧胆酸软胶囊主药含量的方法。方法:分别采用高效液相色谱柱前衍生测定法(一法)和直接测定法(二法)。色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK-C₁₈ 柱,一法流动相为甲醇-0.1%磷酸(80:20, V/V),检测波长为 254 nm,柱温为 40 ℃,流速为 1.0 ml/min,进样量为 10 μl;二法流动相为乙腈-0.001 mol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 值为 2.0, 47:53, V/V),检测波长为 210 nm,柱温为 35 ℃,流速为 1.0 ml/min,进样量为 20 μl。结果:一法和二法熊去氧胆酸检测质量浓度分别在 0.033 71~0.101 12、0.8~3.2 mg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999 8$ 和 $0.999 9$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均 ≤ 1.5%;平均回收率分别为 99.51%、101.40%,RSD 分别为 0.65%、0.69%(均 $n=9$)。结论:两种方法均可满足检测要求,但直接测定法操作更简便,结果更准确、可靠,可作为熊去氧胆酸软胶囊的质量控制方法。

关键词 熊去氧胆酸软胶囊;高效液相色谱法;含量测定

Comparison of 2 Determination Methods of Main Components in Ursodeoxycholic Acid Soft Capsules

SUI Yu-rong¹, DING Yi², HUANG Zhe-su¹(1.Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China; 2.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of main components in Ursodeoxycholic acid soft capsules. METHODS: HPLC method was adopted: pre-column derivatization method (method 1) and direct determination (method 2). The separation was performed on SHISEIDO CAPCELL PAK-C₁₈ column; the condition of method 1: the mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (80:20, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 254 nm and column temperature was 40 ℃. The condition of method 2: the mobile phase consisted of acetonitrile-0.001 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH adjusted to 2.0 with phosphoric acid, 47:53, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear range of ursodeoxycholic acid was 0.033 71-0.101 12 mg/ml by method 1 ($r=0.999 8$) and 0.8-3.2 mg/ml by method 2 ($r=0.999 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than and equal to 1.5%; average recoveries were 99.51% (RSD=0.65%, $n=9$) and 101.40% (RSD=0.69%, $n=9$). CONCLUSIONS: The two methods are in line with the requirements. The method 2 is simple and accurate, and can be used for quality control of Ursodeoxycholic acid soft capsules.

KEY WORDS Ursodeoxycholic acid soft capsules; HPLC; Content determination

熊去氧胆酸软胶囊临床上主要用于胆固醇性胆囊结石、胆汁反流性胃炎以及胆汁淤积性肝病^[1]。该药生产企业标准含量测定采用滴定法,误差大、重复性不好。熊去氧胆酸胶囊、片剂的主药含量测定方法在《英国药典》2013年版^[2]、《美国药典》最新版^[3]和《中国药典》2010年版^[4]中均分别有收载,且均采用高效液相色谱(HPLC)法;亦有文献报道采用HPLC法测定熊去氧胆酸胶囊^[5]、熊去氧胆酸片^[6]中主药的含量。但以上方法均不能解决软胶囊辅料基质对主成分测定的干扰问题。本研究在参考《中国药典》及企业标准基础上,分别采用HPLC

柱前衍生测定法^[7](一法)和直接测定法(二法)测定熊去氧胆酸软胶囊中主药的含量,并分别对两种方法的线性关系、精密性、回收率等结果进行比较,确立以二法即HPLC直接测定法作为熊去氧胆酸软胶囊的质量控制方法。

1 材料

LC-2010A型HPLC仪,包括CLASS-VP数据处理系统等(日本岛津公司);AE260电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);AS 20500AD超声波清洗机(天津市奥特赛恩斯科学仪器有限公司)。

药成方制剂:第十七册[S].WS3-B-3296-98,1998:210.
[2] 庄明蕊,徐丽华.健胃消炎颗粒有效成分含量测定方法的建立[J].齐鲁医学杂志,2007,22(5):447.
[3] 张红霞,金艺,许海燕,等.HPLC法测定胃力片中大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].沈阳药科大学

学报,2007,24(7):417.
[4] 姚仲青.HPLC法同时测定黄连上清丸中大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].中草药,2001,32(8):699.
[5] 陈兴田,黄金华.HPLC法测定导赤丸中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的含量[J].中国医药指南,2011,9(27):179.

*副主任药师,本科。研究方向:生物化学药物分析、药品质量控制。电话:022-23374073。E-mail:tj_plmm@163.com

(收稿日期:2012-09-25 修回日期:2013-03-06)

熊去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110755-9003,质量分数:100.0%);熊去氧胆酸软胶囊(韩国大熊制药株式会社,批号:526800、526810、526820、526830,规格:每粒100 mg);甲醇、乙腈为色谱纯,丙酮、磷酸二氢钾、磷酸为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SHISEIDO CAPCELL PAK-C₁₈柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)。一法其他色谱条件:流动相为甲醇-0.1%磷酸(80:20, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为40 ℃,进样量为10 μl;二法其他色谱条件:流动相为乙腈-0.001 mol/L磷酸二氢钾溶液(磷酸调pH值为2.0,47:53, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 一法 (1)对照品溶液:精密称取熊去氧胆酸对照品约20 mg,置于100 ml量瓶中,加入甲醇适量使溶解,稀释至刻度,即得。(2)供试品溶液:精密称取装量差异项下的内容物约100 mg(相当于熊去氧胆酸20 mg),加甲醇50 ml,搅拌,振摇使熊去氧胆酸完全溶解,静置,精密量取5 ml,置于10 ml量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,即得。(3)阴性对照溶液:按照处方比例称取辅料制成模拟基质(不含熊去氧胆酸)适量(约相当于含熊去氧胆酸20 mg的辅料量),其余同“(2)”项下方法操作,即得。(4)经柱前衍生化处理的待测溶液:精密量取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各2 ml,分别置于衍生反应瓶中,加三乙胺乙腈溶液(1→100)2 ml,2,4-二溴代乙酰苯乙腈溶液(1.5→100)2 ml,密塞,置于80 ℃水浴中加热40 min,放冷至室温,经0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.2.2 二法 (1)对照品溶液:精密称取熊去氧胆酸对照品约50 mg,置于25 ml量瓶中,加入甲醇适量使溶解,稀释至刻度,即得。(2)供试品溶液:精密称取装量差异项下的内容物约500 mg(相当于熊去氧胆酸100 mg),置于小烧杯中,加丙酮15 ml,搅拌均匀使分散,转移至50 ml量瓶中,加甲醇适量超声处理(功率:500 W;频率:40 kHz)5 min,振摇使熊去氧胆酸完全溶解,放冷至室温,加甲醇稀释至刻度,摇匀,静置,滤过,即得。(3)阴性对照溶液:按照处方比例称取辅料制成模拟基质(不含熊去氧胆酸)适量(约相当于含熊去氧胆酸100 mg的辅料量),其余同“(2)”项下方法操作,即得。

分别取“一法”和“二法”项下3种溶液,分别按“2.1”项下相应色谱条件进样,记录色谱,详见图1、图2。

2.3 线性关系考察

2.3.1 一法 取熊去氧胆酸对照品适量,加甲醇溶解制成每1 ml中含熊去氧胆酸1 mg的溶液,分别精密量取0.2、0.3、0.4、0.5和0.6 ml,置于衍生反应瓶中,再分别加甲醇1.8、1.7、1.6、1.5和1.4 ml,分别加三乙胺乙腈溶液(1→100)2 ml与2,4-二溴代乙酰苯乙腈溶液(1.5→100)2 ml,密塞,置于80 ℃水浴中加热40 min,放冷至室温,按照“2.1”项下色谱条件进样测定。以熊去氧胆酸峰面积(y)为纵坐标,检测质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=25\ 218\ 313x+23\ 723$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,熊去氧胆酸检测质量浓度在0.033 71~

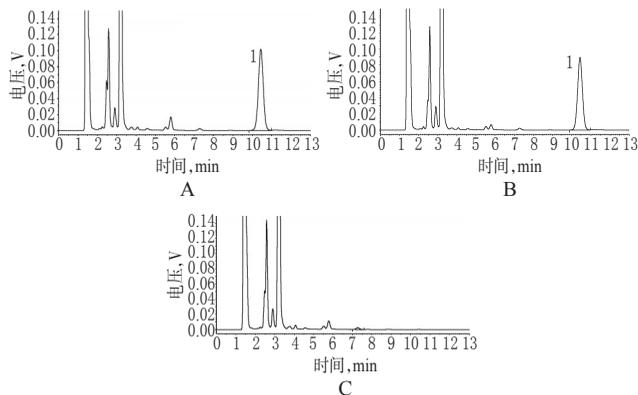


图1 高效液相色谱图(一法)

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 熊去氧胆酸

Fig 1 HPLC chromatogram (method 1)

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. ursodeoxycholic acid

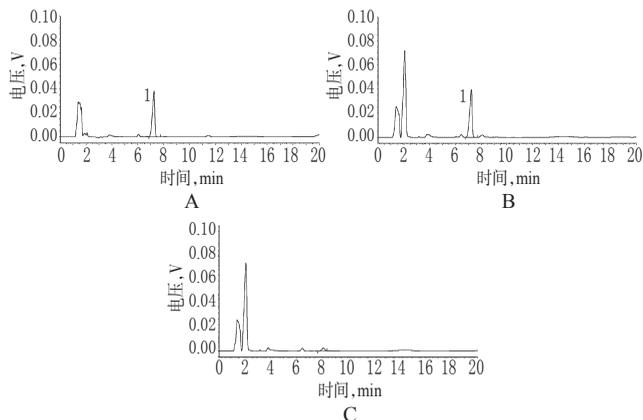


图2 高效液相色谱图(二法)

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 熊去氧胆酸

Fig 2 HPLC chromatogram (method 2)

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. ursodeoxycholic acid

0.101 12 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3.2 二法 取熊去氧胆酸对照品适量,加甲醇溶解制成每1 ml中含熊去氧胆酸4 mg的溶液,分别精密量取2.0、3.5、5.0、6.5和8.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以熊去氧胆酸峰面积(y)为纵坐标,检测质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=250\ 063x-2\ 552$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,熊去氧胆酸检测质量浓度在0.8~3.2 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1 (4)”项下经衍生化处理的对照品溶液与“2.2.2 (1)”项下对照品溶液适量,分别按“2.1”项下相应色谱条件重复进样6次,进行测定。结果,两种方法熊去氧胆酸的RSD均为0.8%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取“2.2.1 (4)”项下经衍生化处理的供试品溶液与“2.2.2 (2)”项下供试品溶液适量,分别按“2.1”项下相应色谱条件于0、2、4、6、8 h进样测定。结果,两种方法熊去氧胆酸的

RSD分别为0.9%、0.8%，表明两种方法的供试品溶液在8 h内均基本稳定。

2.6 重复性试验

取同一批样品(批号:526800)适量,分别按“2.2.1(2)”与“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液各6份,并分别按“2.1”项下相应色谱条件进样测定。结果,两种方法熊去氧胆酸的RSD分别为1.5%、1.1%,表明两种方法重复性良好。

2.7 回收率试验

分别称取混合辅料适量,共9份,以处方量80%、100%、120%的比例分别加入对照品,再分别按“2.2.1(2)”与“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,并分别按“2.1”项下相应色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test(n=9)

方法	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
一法	40.33	40.11	99.45	99.51	0.65
	40.20	39.68	98.71		
	40.11	39.87	99.40		
	50.35	50.47	100.24		
	49.73	49.22	98.97		
	49.31	48.99	99.35		
	59.79	60.03	100.40		
	58.74	58.90	100.27		
	60.57	59.85	98.81		
二法	80.53	81.19	100.82	101.40	0.69
	83.05	84.11	101.28		
	80.83	80.88	100.06		
	104.84	107.09	102.15		
	100.83	101.71	100.87		
	100.68	102.44	101.75		
	121.08	123.26	101.80		
	120.73	122.84	101.75		
	122.02	124.65	102.16		

2.8 样品含量测定

取各批次样品,分别按“2.2.1(2)”与“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,并分别按“2.1”项下相应色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量,结果见表2。

3 讨论

一法所使用的2,4-二溴代乙酰苯衍生剂的纯度及生产厂家的不同对试验结果有影响,会在主峰的位置产生干扰;并且

表2 样品含量测定结果(n=4)

Tab 2 Result of contents determination of samples(n=4)

批号	占标示含量的百分比,%	
	一法	二法
526800	100.87	101.07
526810	98.99	100.83
526820	98.05	98.65
526830	99.23	98.98

在衍生化试验中由于高温易导致溶液中的有机溶剂挥发,试验过程较为烦琐,操作不当会影响重复性,不适宜作为产品的质量控制方法。二法则避免了上述问题。

软胶囊因为辅料基质的存在往往在样品的溶解上存在问题,二法中加入丙酮后使其易分散,主成分更易溶出。丙酮虽然在样品色谱峰中有杂质峰出现,但通过调整流动相比(有机相降低约2%),即可与主峰分离,分离度约为2.5,操作简单,也可以避免毒性较大的衍生化试剂对环境的污染。

采用二法避免了碱滴定法滴定终点不好判断的缺点,检测的灵敏度显著提高,适用于熊去氧胆酸软胶囊的含量测定。

综上所述,操作简便,结果准确、可靠的二法可作为熊去氧胆酸软胶囊的质量控制方法。

(致谢:在此向为本研究提供帮助的中国海南泽世药业有限公司和韩国大熊制药株式会社表示感谢!)

参考文献

- [1] 赵宇.熊去氧胆酸与羟甲烟胺治疗慢性乙型肝炎肝内胆汁淤积的疗效比较[J].中国药房,2011,22(44):4 161.
- [2] British Pharmacopeia Commission. BP 2013[S].2012: 3 489.
- [3] The United States Pharmacopeial Convention. USP 35-NF 30[S].2012:5 518.
- [4] 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,2010:1 106.
- [5] 陈华,梁蔚阳.高效液相色谱法测定熊去氧胆酸胶囊中有关物质的含量[J].药物生物技术,2005,12(4):248.
- [6] 张燕,佟爱东.高效液相色谱法测定熊去氧胆酸片的含量[J].中国药品标准,2012,13(5):359.
- [7] 郑兴.柱前衍生 RP-HPLC 法测定熊去氧胆酸的含量[J].科技信息,2007(32):388.

(收稿日期:2013-02-18 修回日期:2013-04-19)

国家卫生和计划生育委员会副主任刘谦赴国家人口计生委科研所考察调研

本刊讯 2013年5月24日,国家卫生和计划生育委员会副主任刘谦前往国家人口计生委科学技术研究所调研和指导工作。

国家人口计生委科学技术研究所成立于1979年,是以开展人类生殖与计划生育/生殖健康基础及应用研究为主的多学科、综合性的社会公益型国家级科研机构,也是世界卫生组织人类生殖研究合作中心。刘谦考察了科研所重点实验室,观看了计划生育技术服务信息监测、管理与服务平台的演示,听取了所负责同志对科研所发展历史、科研布局、重点工作、建设项目以及面临问题的汇报。

刘谦充分肯定了科研所30多年来对计划生育科技事业做出的贡献,也代表新组建的国家卫生和计划生育委员会向科研所同志表示问候,并对科研所未来发展提出四点要求:一是在原有工作基础上理清改革与发展的思路,发扬传统,充分发挥基本功能和已有优势,再创佳绩。二是要服务中心,致力于解决计划生育事业发展中的重点科学问题。三是要加强开放与联合,加强与健康相关学术单位的合作,实现协同创新。四是要形成特色,科学研究需要长期积累,要准确定位,咬定目标,才能出成果。