

吗多明片的含量及有关物质测定方法改进

韩淑芹^{1*},白晓杰²(1.齐齐哈尔市第一医院药学部,黑龙江齐齐哈尔 161005;2.本溪市本钢南地医院门诊药房,辽宁本溪 117000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1674-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.30

摘要 目的:改进测定吗多明片含量及有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法测定吗多明片含量及有关物质,并采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法对破坏试验降解杂质进行定性。色谱柱为 Waters Symmetry-C₁₈,流动相为 0.05% 甲酸-甲醇(梯度洗脱),流速为 1.0、0.2 ml/min(分别用于含量及有关物质测定、质谱分析),检测波长为 210 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20、5 μl(分别用于含量及有关物质测定、质谱分析)。结果:该色谱条件下各组分之间分离度良好;降解杂质成分得到确认;吗多明检测质量浓度线性范围为 4.0~28.0 μg/ml($r=0.9997$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<1%;吗多明加样回收率为 97.74%~100.70%,RSD=0.49%($n=9$)。结论:本方法简便、准确、专属性好、精密度高,可完善吗多明片的质量控制。

关键词 吗多明片;高效液相色谱法;质谱法;含量;有关物质

Improvement of the Determination Method of Content and Related Substances of Molsidomine Tablet

HAN Shuqin¹, BAI Xiaojie² (1.Dept. of Pharmacy, the First Hospital of Qiqihaer City, Heilongjiang Qiqihaer 161005, China; 2.Dept. of Outpatient Pharmacy, Benxi Steel South Hospital of Liaoning Benxi City, Liaoning Benxi 117000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the method for the determination of content and related substances of Molsidomine tablet. METHODS: HPLC was adopted to determine the content and related substances, HPLC-MS was adopted for the qualitative degradation impurities in destruction test. The column was Waters Symmetry-C₁₈ with mobile phase of 0.05% formic acid - methanol (gradient elution) at a flow rate 1.0 ml/min and 0.2 ml/min (respectively for content and related substances determination, mass spectrometry), the detection wavelength was 210 nm, column temperature was 30 ℃, the injection volume was 20 μl and 5 μl (respectively for content and related substances determination, mass spectrometry). RESULTS: Each component was well separated under chromatographic conditions; degradation impurities were confirmed; the linear range of molsidomine was 4.0-28.0 μg/ml ($r=0.9997$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 97.74%-100.70% (RSD=0.49%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate with good specific and high precision, and can improve the quality control of Molsidomine tablet.

KEYWORDS Molsidomine tablet; HPLC; MS; Content; Related substance

吗多明(Molsidomine),化学名为*N*-3-(4-吗啉基)斯德酮亚胺,为钙拮抗药,可扩张血管平滑肌(特别是静脉和小静脉的平滑肌),使血压轻度下降,回心血量减少,心排血量降低,心脏工作负荷减轻,心肌氧耗减少;此外,尚能扩张冠状动脉,促进侧枝循环,改善缺血心肌部位的血液分布,作用迅速而持久,临床可用于防治心绞痛的发作^[1-2]。吗多明片收载于《国家药品标准》第六册^[3],采用紫外分光光度法测定含量,原料药和片剂的有关物质检测没有建立方法。本研究通过查阅资料和试验,通过高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法将破坏试验降解杂质进行定性,并参考相关资料^[4],建立了以HPLC法测定吗多明片的含量及有关物质的方法。

1 材料

1.1 仪器

2695e HPLC 仪,包含 Waters22487 紫外检测器和 Empower 工作站(美国 Waters 公司);SK2510HLC 型超声波机(上海科导超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:50 kHz);BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

吗多明对照品(上海博顿生物化工有限公司提供,批号:420003-201301,纯度:99.95%);吗多明杂质 A、B、C、D、E 对照品(上海博顿生物化工有限公司提供,批号:MM0147.21、MM0147.07、MM0147.14、MM0147.36、MM0147.02,纯度:99.5%、99.2%、99.5%、99.5%、99.6%);吗多明片(北京双鹤现代医药技术有限责任公司,批号:131102、130911、130428,规格:2 mg);甲醇为色谱纯,甲酸为优级纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Waters Symmetry-C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:流动相 A 为 0.05% 甲酸,流动相 B 为甲醇,采用梯度洗脱(0~3 min,80% A;3~15 min,80%→20% A;15~20 min,20%→80% A);流速:1.0、0.2 ml/min(分别用于含量及有关物质测定、质谱分析);检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20、5 μl(分别用于含量及有关物质测定、质谱分析)。

2.1.2 质谱条件 电离源:ESI;扫描方式:正离子全扫描;扫描范围:0~250 *m/z*;源电压:3 500 kV;毛细管温度:270 ℃;鞘气流速:15 L/min;辅助气流速:5 L/min。

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0452-2459574

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 取吗多明对照品和杂质A、B、C、D、E对照品各适量,精密称定,加甲醇适量超声10 min使溶解,用甲醇定量稀释制成每1 ml中含吗多明8 μg和各杂质0.8 μg的混合溶液,作为系统适用性溶液。

2.2.2 含量测定供试品溶液 取样品20片,研细,精密称取适量(约相当于吗多明8 mg),置于50 ml量瓶中,加甲醇适量超声10 min使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续取滤液5 ml,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为含量测定供试品溶液。

2.2.3 含量测定对照品溶液 取吗多明对照品16 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加甲醇适量超声10 min使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为含量测定对照品贮备液。精密量取该贮备液5 ml,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为含量测定对照品溶液。

2.2.4 含量测定空白溶液 按处方比例制备吗多明片的空白样品,按“2.2.2”项下方法制得含量测定空白溶液。

2.2.5 有关物质供试品溶液 取样品细粉适量(约相当于吗多明8 mg),置于50 ml量瓶中,加甲醇适量超声10 min使溶解,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,作为有关物质供试品溶液。

2.2.6 有关物质对照溶液 精密量取“2.2.5”项下的有关物质供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,作为有关物质对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性考察

2.3.1 系统适用性考察 分别精密量取“2.2”项下系统适应性溶液、含量测定供试品溶液、含量测定对照品溶液、含量测定空白溶液各20 μl,注入HPLC仪,记录色谱,详见图1。结果表明,吗多明的理论板数>6 000,单个杂质的理论板数均>4 000,拖尾因子在0.95~1.05之间,各组分之间分离度>2.0。

2.3.2 专属性考察 取样品细粉适量(约相当于吗多明8 mg),共6份,其中5份分别用强酸(加入1 mol/L盐酸溶液5 ml,水浴加热1 h,用1 mol/L氢氧化钠溶液调pH至中性)、强碱(加入1 mol/L氢氧化钠溶液5 ml,水浴加热1 h,用1 mol/L盐酸溶液调pH至中性)、强氧化剂(加入5%过氧化氢溶液5 ml,水浴加热10 min)、高温(加入水5 ml,水浴加热2 h)和日光(加入水5 ml,光照48 h)进行破坏试验,另有1份未经破坏试验处理(加入水5 ml)。分别取上述经和未经破坏试验的供试品溶液,加甲醇制成每1 ml中各约含吗多明8 μg的溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样20 μl,记录色谱至吗多明峰保留时间的2倍。结果表明,样品对高温稳定,无杂质生成,而在强酸、强碱和光照条件下杂质B和/或杂质E会出峰,且杂质B的峰面积会增大;在氧化条件下杂质A和杂质B均会出峰,且杂质B的峰面积会增大;另外,各成分之间分离度均>3.0,详见图2。

2.3.3 降解杂质定性 取酸、碱、氧化、光照破坏后的供试品溶液适量,分别按“2.1.2”项下质谱条件进样5 μl,记录HPLC-MS图,详见图3。结果,图3A和图3B显示 m/z 88.10的 $[M+H]^+$ 离子和117.07的 $[M+H]^+$ 离子,表明其相对分子质量为88和117,与杂质E($C_4NO_2H_5$,相对分子质量86)和杂质B($C_6N_2O_2H_8$,相对分子质量116)一致;图3C和图3D显示 m/z 117.05的 $[M+H]^+$ 离子和171.20的 $[M+H]^+$ 离子,表明其相对分子质量为117和171,与杂质B($C_6N_2O_2H_8$,相对分子质量116)和杂质A($C_6N_2O_2H_{10}$,相对分子质量170)一致;图3E显示 m/z 117.03的 $[M+H]^+$ 离子,表明其相对分子质量为117,与杂质B($C_6N_2O_2H_8$,相对分子质量116)一致。

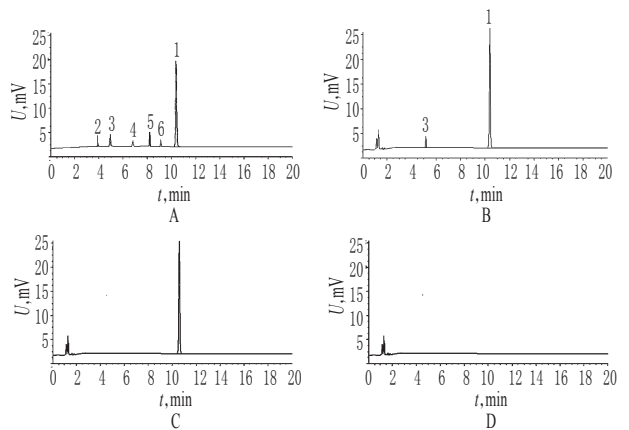


图1 系统适用性高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.含量测定供试品溶液;C.含量测定对照品溶液;D.含量测定空白溶液;1.吗多明;2.杂质A;3.杂质B;4.杂质C;5.杂质D;6.杂质E

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability

A.system suitability solution;B.test sample solution of content determination;C.reference substance solution of content determination;D.blank solution of content determination;1.molsidomine;2.impurity A;3.impurity B;4.impurity C;5.impurity D;6.impurity E

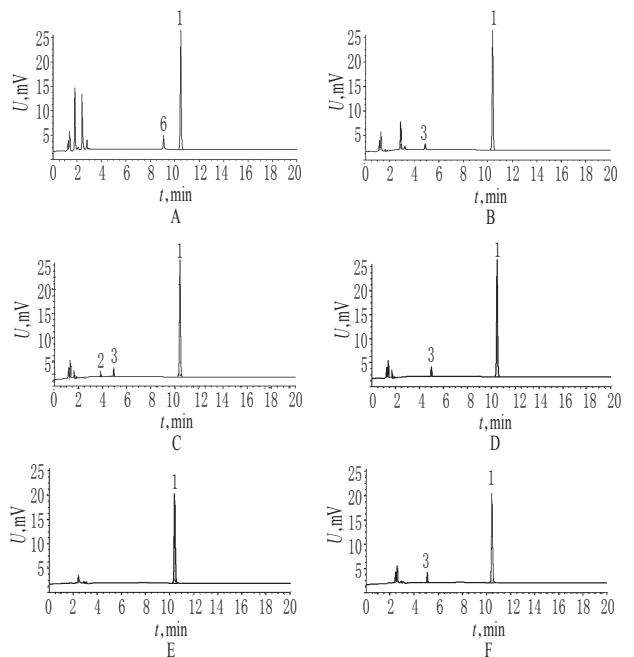


图2 专属性高效液相色谱图

A.酸破坏;B.碱破坏;C.氧化破坏;D.光破坏;E.热破坏;F.未破坏;1.吗多明;2.杂质A;3.杂质B;6.杂质E

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity

A.acid damage;B.alkali damage;C.oxidation damage;D.light damage;E.thermal damage;F.no damage;1.molsidomine;2.impurity A;3.impurity B;6.impurity E

2.4 线性关系考察

精密量取吗多明对照品适量,以甲醇定量稀释成每1 ml含吗多明4、12、16、20、24、28 μg的系列对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别精密量取20 μl注入HPLC仪进样,记录峰面积。以吗多明的峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x , μg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $y=103.4x+47.278$ ($r=0.9997$)。结果表明,吗多明检测质量浓度线性范围为4.0~28.0 μg/ml。

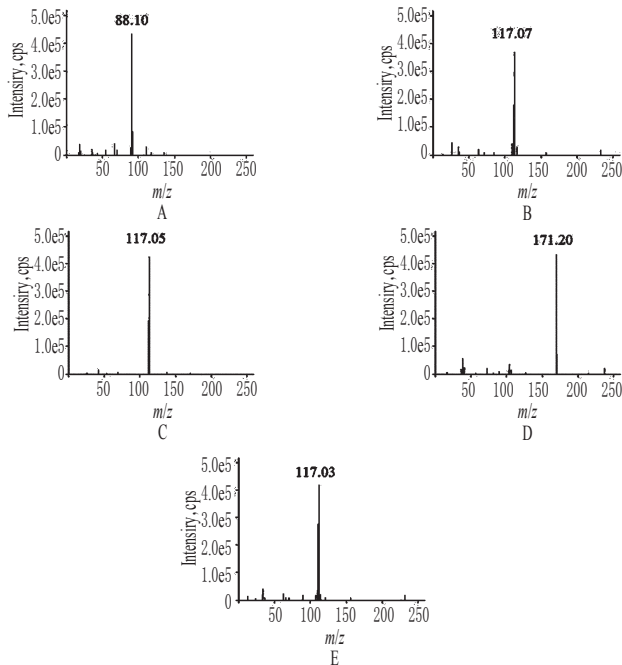


图3 降解产物质谱图

A.酸破坏降解产物(杂质E);B.碱破坏降解产物(杂质B);C.氧化破坏降解产物(杂质B);D.氧化破坏降解产物(杂质A);E.光照破坏降解产物(杂质B)

Fig 3 Mass spectrum of degradation products

A.degradation products by acid damage (impurity E); B.degradation products by alkali damage (impurity B); C.degradation products by oxidation damage (impurity B); D.degradation products by oxidation damage (impurity A); E.degradation products by light damage (impurity B)

2.5 检测限和定量限

取“2.3.1”项下系统适用性溶液逐级稀释,分别按“2.1.1”项下色谱条件进样20 μl,记录峰面积并计算吗多明的质量浓度,当信噪比为10时测得定量限为1.6 ng;当信噪比为3时测得检测限为0.8 ng。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.3”项下含量测定对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件注入HPLC仪,连续进样6次,测定峰面积。结果,吗多明峰面积的RSD=0.56% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一批号(131102)的样品适量,按“2.2.2”项下方法制备含量测定供试品溶液,分别于室温(20~25℃)下放置0、2、4、8、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,吗多明峰面积的RSD=0.75% (n=6),表明含量测定供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批号(131102)的样品适量,按“2.2.2”项下方法平行制备6份含量测定供试品溶液,分别按“2.1.1”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,吗多明平均含量为99.7%,RSD=0.78% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批号(131102)样品细粉(约相当于吗多明8 mg),共9份,分别置于50 ml量瓶中,按80.0%、100.0%、120.0%比例精密加入吗多明对照品,各3份,分别按

“2.2.2”项下方法制备含量测定供试品溶液,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 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test (n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
7.824	6.514	14.191	97.74		
7.837	6.525	14.278	98.71		
7.639	6.533	14.057	98.24		
7.775	8.021	15.852	100.70		
7.782	8.020	15.774	99.65	99.17	0.49
7.804	8.061	15.775	98.88		
7.792	9.621	17.364	99.49		
7.816	9.604	17.481	100.64		
7.788	9.605	17.244	98.45		

2.10 样品含量测定结果

取3批(131102、130911、130428)样品和对照品各适量,分别按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备含量测定供试品溶液和含量测定对照品溶液,再分别按“2.1.1”项下色谱条件注入HPLC仪,记录峰面积,按外标法以峰面积计算吗多明的含量。结果,测得3批样品平均含量分别为98.6%、98.4%、98.9%,RSD分别为0.78%、0.82%、0.84% (n=3)。再分别采用紫外分光光度法测定,测得3批样品含量分别为99.7%、99.6%、100.1%,RSD分别为0.88%、0.84%、0.92% (n=3)。

2.11 样品有关物质测定结果

取3批(131102、130911、130428)样品各适量,分别按“2.2.5”“2.2.6”项下方法制备有关物质供试品溶液和有关物质对照溶液,取有关物质对照溶液20 μl注入HPLC仪,调整灵敏度,使主成分的峰高为记录满量程的20%~25%;再量取有关物质供试品溶液20 μl进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的2倍。有关物质供试品溶液中各杂质峰面积之和不得大于对照溶液的主峰面积(1%),单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.1倍(0.1%)。结果,按上述方法进行检查,测得3批样品杂质总量分别为0.10%、0.11%、0.09%,RSD分别为0.87%、0.89%、0.95% (n=3)。

3 讨论

3.1 含量测定方法的确定

《国家药品标准》采用紫外分光光度法测定吗多明片含量,受辅料和测定方法的影响,该方法测定结果不能真实反映吗多明片的含量。本研究同时采用紫外分光光度法和HPLC法两种方法测定含量,经比较,紫外分光光度法比HPLC法的测定结果高1%,从计算结果可以看出HPLC法准确度、灵敏度更高,更适用于吗多明片的含量测定。

3.2 破坏试验降解产物的确定

根据合成路线,吗多明的5个有关物质均为成品中可能存在的原料、中间体和降解产物^[5-6]。经质谱分析,在强酸、强碱条件下吗啉基易与酸、碱反应产生杂质B、E,在氧化条件下易被氧化生成杂质A、B,在光照条件下易产生杂质B。所以在操作过程中尤应注意避光操作。

3.3 有关物质测定方法的确定

《国家药品标准》对吗多明原料药和吗多明片的有关物质检查没有规定。本试验采用1%自身对照法测定吗多明片的有关物质,结果符合要求。建议今后相关标准中增加有关物质检查项,以为保证产品质量提供更为科学、准确的依据。

双参胶囊的质量标准提高研究

崔小敏*,李芳,李凡,王卫锋*(陕西省中医药研究院,西安 710003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1677-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.31

摘要 目的:优化和提高双参胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的郁金、熟地黄进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中丹酚酸B的含量;色谱柱为Diamonsil C₁₈(2),流动相为乙腈-0.1%磷酸(22:78, V/V),流速为0.5 ml/min,检测波长为286 nm,柱温为30 ℃,进样量为2 μl。结果:郁金、熟地黄的TLC图斑点清晰,分离度好;丹酚酸B检测进样量线性范围为0.079 2~0.792 μg($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为100.71%~101.82%(RSD=0.50%, $n=6$)。结论:经优化和提高的标准可用于双参胶囊的质量控制。

关键词 双参胶囊;丹酚酸B;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on Improvement of Quality Standard of Shuangshen Capsule

CUI Xiaomin, LI Fang, LI Fan, WANG Weifeng (Shaanxi Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard of Shuangshen capsule. METHODS: TLC was conducted for the qualitative identification of *Curcumnae radix* and *Rehmannia glutinosa* in the preparation. HPLC was used for the content determination of salvianolic acid B in the preparation: the column was Diamonsil C₁₈(2) with mobile phase of acetonitrile-0.1% H₃PO₄(22:78, V/V) at a flow rate of 0.5 ml/min, detection wavelength was 286 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 2 μl. RESULTS: The TLC spots of *C. radix* and *R. glutinosa* were clear and well separated; the linear range of salvianolic acid B was 0.079 2-0.792 μg($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%; recovery was 100.71%-101.82%(RSD=0.50%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established standard can be used for the quality control of Shuangshen capsule.

KEYWORDS Shuangshen capsule; Salvianolic acid B; TLC; HPLC

双参胶囊为陕西省中医医院制剂,具有活血化瘀、化痰开窍之功,用于各种脑卒中后遗症和心血管病的治疗。该制剂由丹参、人参、远志、郁金、熟地黄、川芎等药材组成,其原质量标准中仅有针对人参、丹参和川芎的薄层色谱(TLC)鉴别等检验项目,无含量测定项。为了更好地控制该制剂的质量,在原质量标准的基础上,参照有关文献^[1-3],本试验采用TLC法对其中的药材进行定性分析,增加了郁金和熟地黄的鉴别项,并采用高效液相色谱(HPLC)法^[4-11]对其中丹参的主要药效成分丹酚酸B进行了定量分析。

1 材料

1.1 仪器

H-CLSS型HPLC仪,包括紫外可见检测器、Empower化学工作站(美国Waters公司);UV-8型三用紫外仪(无锡科达仪器厂);KQ-100型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);BT125D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

双参胶囊(陕西省中医医院自制,批号:140302、140305、140311,规格:0.4 g/粒);郁金对照药材(批号:120949-200504)、熟地黄对照药材(批号:121196-200803)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201514,纯度:93.7%)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

综上所述,本方法简便、准确、专属性好、精密度高,可完善吗多明片的质量控制。

参考文献

- [1] 陈军熏,黄春辉,陈念,等.吗多明的药理和临床应用[J].福建医药杂志,1987,9(2):31.
- [2] Rudolph W,何梅先.吗多明在劳力型心绞痛和慢性充血性心力衰竭长期治疗中的作用[J].国外医学心血管疾病分册,1985(1):29.

- [3] 国家药典委员会.新药转正标准:38册[M].北京:化学工业出版社,2000:102.
- [4] 英国药品委员会.英国药典卷II[S].2009年版.伦敦: The Stationery Office出版社,2009:1 701.
- [5] 顾纪明,胡钧,林德昌,等.吗导敏片处方工艺改进[J].中国医药工业杂志,1982(1):38.
- [6] 祁祥法.吗导敏临床研究的进展[J].上海医药,2002,12(6):552.

* 研究实习员,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:029-87289907。E-mail: 369803637@qq.com

通信作者:主任中药师,硕士。研究方向:中药新药研发。电话:029-87251832。E-mail: 1196821692@qq.com

(收稿日期:2015-05-16 修回日期:2016-03-16)
(编辑:周 箭)