

HPLC法测定他米巴罗汀片的溶出度

陈丽姣^{1*}, 杨冬霞², 赵艳霞^{3#}(1. 山东理工职业学院, 山东 济宁 272067; 2. 山东创新药物研发有限公司, 济南 250101; 3. 山东省医学科学院研究生教育中心, 济南 250062)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)30-4304-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.30.42

摘要 目的: 建立测定他米巴罗汀片溶出度的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈, 流动相为甲醇-水-冰乙酸(85:15:1, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 235 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 20 μl。溶出度测定采用桨法, 以 pH6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质, 溶出介质体积为 900 ml, 转速为 50 r/min, 60 min 取样。结果: 他米巴罗汀检测质量浓度线性范围为 0.801~2.804 μg/ml ($r=0.999\ 6$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 3%; 回收率分别为 99.58%~100.90% (RSD=0.25%, $n=9$); 3 批样品的溶出度测定结果分别为 98.25%、96.54%、92.38% ($n=6$)。结论: 该方法简便、准确, 灵敏度高, 专属性强, 适用于他米巴罗汀片的溶出度测定。

关键词 高效液相色谱法; 他米巴罗汀片; 溶出度

Dissolution Determination of Tamibarotene Tablet by HPLC

CHEN Lijiao¹, YANG Dongxia², ZHAO Yanxia³(1. Shandong Polytechnic College, Shandong Jining 272067, China; 2. Shandong Chuangxin Pharmaceutical Research and Development Co. Ltd., Jinan 250101, China; 3. Graduate Education Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the dissolution determination of Tamibarotene tablet. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamonsil C₁₈ with mobile phase of methanol-water-acetic acid (85:15:1, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 235 nm, column temperature was 25 ℃, and injection volume was 20 μl. The paddle method was used to determine the dissolution, using pH6.8 phosphate buffer dissolution as medium, medium volume was 900 ml, the rotating speed was 50 r/min, taking samples after 60 min. RESULTS: The linear range of tamibarotene was 0.801-2.804 μg/ml ($r=0.999\ 6$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 99.58%-100.90% (RSD=0.25%, $n=9$); the accumulative dissolution rate of 3 batches of samples was 98.25%, 96.54%, 92.38% ($n=6$). CONCLUSIONS: The method simple, accurate with high sensitivity and specificity, and suitable for the dissolution determination of Tamibarotene tablet.

KEYWORDS HPLC; Tamibarotene tablet; Dissolution

急性早幼粒细胞白血病 (APL) 是一种特殊类型急性髓系白血病, 病程发展迅速, 死亡率高^[1]。APL 患者存在染色体 t(15; 17) 易位, 该易位导致分别定位于染色体 15q22 和 17q21 的病变更蛋白与维 A 酸受体 (RAR) α 嵌合, 形成 PML-RAR α 融合基因^[2-4]。他米巴罗汀 (Tamibarotene) 化学名为 4-[(5, 6, 7, 8-四氢-5, 5, 8, 8-四甲基-2-萘基) 甲酰] 苯甲酸, 它是一个新的 RAR α 促进剂, 对复发或难治性急性前骨髓细胞性白血病 (即 APL) 具有显著的分化诱导能力, 从而可产生治疗作用。其片剂由日本新药株式会社研制开发, 于 2005 年在日本首次上市 (商品名: Amnolake, 规格: 2 mg)^[5-6], 该药口服后吸收迅速、疗效确切、副作用小^[7]。目前, 其仿制药我国有几家研发单位正在申

报临床, 国内市场空间巨大。为了保障药品质量和用药安全, 笔者参照 2015 年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”^[8]和《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[9]中的相关要求, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立了国产他米巴罗汀片的溶出度测定方法。

1 材料

1.1 仪器

600E-2487 型 HPLC 仪, 包括 600E 多溶剂输送系统 (有梯度控制器的高压输液泵)、在线脱气机、Rheodyne 7725i 手动进样阀、2487 双通道紫外检测器等 (美国 Waters 公司); ZRS-8G 型智能溶出试验仪 (天津市天大天发科技有限公司); AX105

研究[J]. 中国中医急症, 2014, 23(2): 271.

[6] 黄震华. 心力衰竭治疗现状和展望[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(5): 321.

[7] 赵海誉, 王秀坤, 陆景珊. 北葶苈子中挥发油及脂肪油类

成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(6): 827.

[8] 弓建红, 张艳丽, 冯卫生, 等. GC-MS 分析南葶苈子挥发油成分的研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(9): 1 942.

[9] 郭丹, 陈娜. HPCE 法鉴别南葶苈子和车前子[J]. 中国药房, 2009, 20(9): 683.

(收稿日期: 2016-01-14 修回日期: 2016-03-23)

(编辑: 张静)

* 讲师, 硕士研究生。研究方向: 仪器分析。电话: 0537-3617622。
E-mail: hahachenlijiao@126.com

通信作者: 副研究员, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0531-58672115。E-mail: mls_zhaoyx@ujn.edu.cn

DR型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

他米巴罗汀片(济南康和医药科技有限公司,批号:20130401、20130402、20130403,规格:2 mg);他米巴罗汀对照品(济南康和医药科技有限公司,批号:20130301S,纯度:99.9%);甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[10]

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-冰乙酸(85:15:1,V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:235 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取对照品适量,精密称定,加甲醇10 ml使溶解,用溶出介质pH6.8磷酸盐缓冲液(取0.2 mol/L磷酸二氢钾溶液250 ml,加0.2 mol/L氢氧化钠溶液118 ml,用水稀释至1 000 ml,摇匀,即得)稀释制成每1 ml中含约2 μg的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,采用2015年版《中国药典》(四部)“溶出度与释放度测定法”第二法(桨法),以pH6.8磷酸盐缓冲液为溶出介质,溶出介质体积为900 ml,转速为50 r/min,温度为(37±0.5)℃,依法操作,于60 min时取溶出液10 ml,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 滤膜吸附试验

取按“2.2.1”项下方法制备的对照品溶液适量,作为滤过前溶液;取上述滤过前溶液适量,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为滤过后溶液。分别取滤过前、后溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量,以滤过前含量为100%,计算滤膜吸附量。结果表明,0.45 μm微孔滤膜对他米巴罗汀的吸附量<2.0%,符合规定^[9]。

2.4 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和溶出介质各20 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,供试品和对照品色谱中主峰的保留时间一致;各成分峰基线分离良好,且其他成分对主成分测定无干扰。

2.5 线性关系考察

取对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加甲醇10 ml使溶解,以溶出介质pH6.8磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,精密量取10 ml,置于50 ml量瓶中,用pH6.8磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取上述贮备液2、3、4、5、6、7 ml,分别置于50 ml量瓶中,加pH6.8磷酸盐缓冲液稀释至刻度,配制成质量浓度分别为0.8~2.8 μg/ml的系列对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以他米巴罗汀质量浓度(x, μg/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 $y=101\ 023x-1\ 924.4$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,他米巴罗汀检测质量浓度线性范围为0.801~2.804 μg/ml。

2.6 精密度试验

2.6.1 仪器精密度 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的RSD=0.25%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6.2 中间精密度 取同一批样品(批号:20130401)6片,由不同人员分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,各6份,分别在不同仪器上(Waters 600型和Waters 2695型HPLC仪)按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算溶出度。结果,他米巴罗

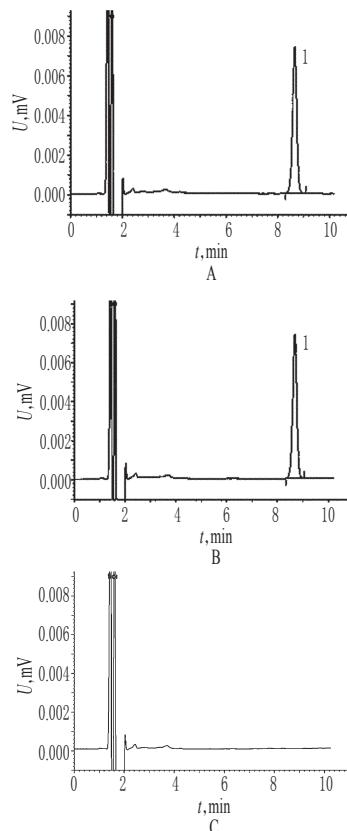


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.溶出介质;1.他米巴罗汀

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.dissolution medium; 1.tamibarotene

汀片的平均溶出度分别为98.42%、97.25%,RSD分别为2.06%、2.14%($n=6$),表明本方法的中间精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20130401)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、6、8 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的RSD=0.37%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20130401)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,他米巴罗汀峰面积的RSD=0.74%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取对照品约12、16、20 mg,每种质量各3份,置于不同的100 ml量瓶中,再分别按样品处方比例混合辅料,加甲醇10 ml使溶解,加溶出介质pH6.8磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,滤过,分别精密量取续滤液1 ml,置于100 ml量瓶中,加pH6.8磷酸盐缓冲液稀释至刻度,摇匀,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算回收率,结果见表1。

2.10 溶出度均一性试验

取批号20130401的样品6片,各按“2.2.2”项下方法进行溶出度试验,分别在5、15、30、45、60 min时取溶出液10 ml(同时补充溶出介质10 ml),滤过,取续滤液适量,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他米巴罗汀在各时间点的累积溶出度(详见表2),并绘制溶出曲线(详见图

2)。结果,6片样品溶出曲线趋势基本相同,在各时间点的累积溶出度的RSD均<2%,表明样品同一批次内的溶出度均一性良好。

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,%
12.73	12.78	100.39		
12.82	12.86	100.31		
12.29	12.40	100.90		
16.18	16.24	100.37		
16.27	16.41	100.86	100.30	0.25
16.66	16.76	100.60		
19.97	19.94	99.85		
20.31	20.27	99.80		
19.06	18.98	99.58		

表2 各时间点的累积溶出度测定结果(%)

Tab 2 Determination results of cumulative dissolution at each time point(%)

取样时间, min	测定次数						平均累积溶出度	RSD
	1	2	3	4	5	6		
5	77.52	76.24	77.21	75.51	77.27	77.61	76.89	1.09
15	89.78	90.38	89.53	90.13	89.44	89.70	89.83	0.40
30	100.16	98.68	98.96	100.44	99.82	100.27	99.72	0.74
45	101.57	101.67	98.98	100.02	99.52	98.73	100.08	1.27
60	99.26	98.54	99.82	94.92	97.51	99.50	98.26	1.86

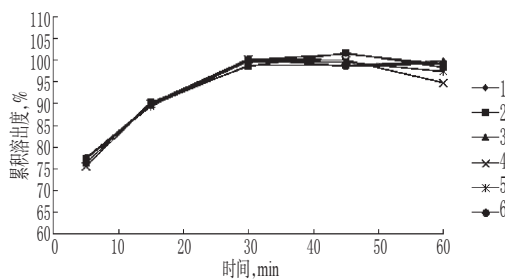


图2 溶出曲线

Fig 2 Dissolution curves

2.11 样品溶出度测定

取3批样品各6片,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算每片的溶出度及平均值(要求均≥标示量的75%),结果见表3。

表3 样品溶出度测定结果(n=6,%)

Tab 3 Determination results of dissolution of samples(n=6,%)

样品批号	测定次数						平均值
	1	2	3	4	5	6	
20130401	99.10	97.95	97.83	99.61	96.69	98.32	98.25
20130402	98.67	96.01	99.12	99.68	94.28	91.48	96.54
20130403	92.31	90.30	92.86	93.10	92.44	93.25	92.38

3 讨论

3.1 溶出介质体积的选择

根据《普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则》^[9]的要求,口服固体制剂溶出度测定溶出介质体积一般采用900 ml或1 000 ml,方可符合漏槽条件,并能满足溶出度测定方法的要求。考虑到样品规格为2 mg,规格较小,为了提高灵敏度,笔者参考相关文献^[10],选用900 ml作为本试验溶出介质的体积。

3.2 溶出介质的选择

口服固体制剂溶出度测定所用溶出介质一般采用水、0.1 mol/L 盐酸溶液(pH1.0)、pH4.5 乙酸盐缓冲液和pH6.8 磷酸盐缓冲液等。本试验前期曾分别选用以上4种溶出介质进行预试验(其他试验条件不变),结果发现,他米巴罗汀在0.1 mol/L 盐酸溶液(pH1.0)和pH4.5 乙酸盐缓冲液介质中60 min时的溶出度均比较低,而在水和pH6.8 磷酸盐缓冲液介质中45~60 min时的溶出度比较高;进一步分析发现在水介质中的溶出曲线未出现拐点,而在pH6.8 磷酸盐缓冲液中溶出曲线有明显的拐点。故本试验最终选择了与文献^[10]方法一致的溶出介质pH6.8 磷酸盐缓冲液。

3.3 转速的选择

本试验前期还对溶出度试验的转速进行了考察。通过比较发现以50 r/min作为转速,溶出速率已较快。在水、pH6.8 磷酸盐缓冲液中5 min时溶出度均>60%,15 min时均>80%,即50 r/min的转速可以满足本品溶出度测定要求。

3.4 测定方法的选择

当他米巴罗汀片溶于900 ml的pH6.8 磷酸盐缓冲液中时,主成分质量浓度约为2.2 μg/ml,值非常低,在紫外条件下的吸收度<0.1,会显著影响检测结果的准确性。故本试验最终选择了更为灵敏的HPLC法进行测定。

综上所述,本方法简便、准确,灵敏度高,专属性强,适用于他米巴罗汀片的溶出度测定。

参考文献

- [1] 刘春燕.急性早幼粒细胞白血病的“克星”:全反式维甲酸[J].开卷有益:求医问药,2007(3):10.
- [2] Ohnishi K. PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibarotene, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia[J]. *Int J Clin Oncol*, 2007, 12(5): 313.
- [3] 王杰松,陈志哲.急性早幼粒细胞白血病的治疗现状[J].医学综述,2007,13(11):838.
- [4] 杨立平.他米巴罗汀药理学研究进展[J].中华临床医学杂志,2008,9(7):57.
- [5] Takeuchi M. Clinical experience with a new synthetic retinoid, tamibarotene (Am-80) for relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2006, 33(3): 401.
- [6] Davies SL, Castaner J, Capdevila LG. Tamibarotene[J]. *Drugs Future*, 2005, 30(7): 688.
- [7] 赖树清,须媚.急性早幼粒细胞性白血病治疗药:他米巴罗汀:tamibarotene[J].世界临床药物,2007,28(4):252.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:121-124.
- [9] 国家食品药品监督管理局.普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[S].2009.
- [10] 東光薬品工業(株).アムノレイク錠2mgに関する資料,新薬の承認に関する情報[EB/OL].(2005-06)[2013-06].<http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P200500012/left.html>.

(收稿日期:2015-12-02 修回日期:2016-09-17)

(编辑:周 菁)