

益肝灵分散片的质量标准研究

张永丽, 郑清娉, 张卫华*, 高 丽
(北京因科瑞斯生物制品研究所, 北京 102209)

[摘要] 目的: 建立益肝灵分散片的质量标准。方法: 采用薄层色谱法进行定性鉴别; 采用紫外-可见分光光度法对水飞蓟素进行溶出度测定; 采用高效液相色谱法对水飞蓟宾进行含量测定。结果: 水飞蓟素薄层色谱清晰, 分离度好。水飞蓟素溶出度测定在 $3.1 \sim 31.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好, $r = 0.999 5$, 平均回收率为 99.07% ($\text{RSD} = 0.75\%$)。水飞蓟宾含量测定在 $0.128 \sim 1.280 \mu\text{g}$ 范围内线性良好, $r = 0.999 7$, 平均回收率为 100.12% ($\text{RSD} = 0.89\%$)。结论: 该方法可较好地控制益肝灵分散片的质量。

[关键词] 益肝灵分散片; 薄层鉴别; 溶出度; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)10-0020-04

益肝灵分散片系由益肝灵片^[1]经剂型改革而来的新药, 是以水飞蓟素为原料, 加入快速崩解剂和填充剂等辅料制成的新型速释固体制剂, 具有改善肝功能, 保护肝细胞膜的作用, 用于急慢性肝炎及迁延性肝炎。为有效控制其内在质量, 本文建立了水飞蓟素的薄层鉴别方法, 建立了采用紫外-可见分光光度法进行水飞蓟素溶出度的含量测定方法, 建立了高效液相色谱法进行水飞蓟宾的含量测定方法。

1 仪器与试剂

仪器: 岛津 UV3000 型分光光度测定仪; 美国 HP1100 高效液相色谱仪, HPCHEM 色谱工作站; BT25S 电子天平、BS110S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司) RC-6 药物溶出仪(天津国铭医药设备用有限公司)

试剂: 十二烷基硫酸钠为分析纯(北京化学试剂公司, 批号: 20030518), 无水乙醇为分析醇(北京刘李店化工厂, 批号 20030808), 甲醇为色谱纯(迪马公司), 磷酸为分析纯(北京化工厂), 高纯水。

对照品: 水飞蓟宾对照品: 批号 0856-9902, 由中国药品生物制品检定所提供, 纯度为 98% 以上。

药品: 益肝灵分散片(批号 050907、050912、

[收稿日期] 2009-02-16

[通讯作者] * 张卫华, Tel: (010) 82271393; E-mail: strong_zzz@yahoo.com.cn

050916), 由北京因科瑞斯生物制品研究所试制。益肝灵片(批号 20050121、20050409、20050511), 生产厂家: 惠州九惠制药有限公司。

2 薄层鉴别^[2]

取本品, 研细, 取细粉 0.3 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 15 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取水飞蓟宾对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。按缺水飞蓟素处方及原制备工艺制得缺水飞蓟素的阴性样品, 并按照供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。照薄层色谱法^[3] 试验, 分别吸取上述溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(15:2:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。阴性对照样品显示无干扰。

3 溶出度测定^[5-7]

3.1 操作方法 取本品, 照溶出度测定法第二法(浆法)^[4], 以 1.5% 十二烷基硫酸钠溶液 900 mL 为溶出介质, 转速 100 $r \cdot \min^{-1}$, 分别在 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 时取样适量(同时补充等温同量溶出介质), 以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 照紫外-可见分光光度法^[3], 在 288 nm 的波长处分别测定吸光度; 另取水飞蓟宾对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇溶解, 制成每 1 mL 含 0.15 mg 的溶液, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 15 μ g 的对照品溶液, 同法测定, 计算药物浓度, 求出药物累积溶出百分率, 结果见表 1。

表 1 样品水飞蓟素溶出测定数据表

溶出时间 (min)	累积溶出百分率(%)						平均值	标准差
	1	2	3	4	5	6		
5	36.1	30.8	31.5	34.9	36.6	33.9	34.0	7.03
10	53.5	51.5	50.3	57.8	54.5	55.2	53.8	4.99
20	66.3	64.2	68.9	69.7	65.3	66.8	66.9	3.14
30	79.8	76.2	77.5	76.1	80.8	78.2	78.1	2.44
45	86.3	85.4	84.6	86.1	85.5	83.2	85.2	1.34
60	88.8	87.1	88.5	88.2	87.3	85.2	87.5	1.50

3.2 溶出度曲线 以溶出时间为横坐标, 溶出量为纵坐标, 绘制溶出度曲线, 结果表明, 在以上测定条件下, 在 45 min 后样品的累积释放百分率趋于平稳, 故测定时间定为 45 min。见图 1。

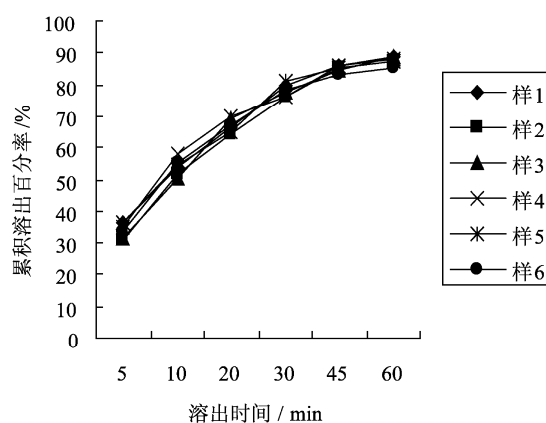


图 1 溶出度曲线

3.3 3 批样品的溶出度检查 取益肝灵分散片(批号为 050907, 050912, 050916), 依据 3.1 操作方法测定, 结果表明 3 批样品在 45 min 水飞蓟素的平均溶出累积释放百分率分别为 84.2%, 82.6%, 83.8%, 均大于标示量 70%。暂定本品在 45 min 时间点测定其溶出累积释放百分率, 限度为标示量的 70%。

3.4 溶出度测定方法的验证

3.4.1 专属性试验 按处方比例, 制备不含水飞蓟素的空白片, 照溶出度测定法^[4], 以 1.5% 十二烷基硫酸钠溶液 900 mL 作为溶剂, 转速 100 $r \cdot \min^{-1}$, 45 min 各取样 5 mL(同时补充等温同量溶出介质), 以 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 照紫外-可见分光光度法^[3], 在 288 nm 的波长处分别测定吸光度, 结果显示其吸收度值几乎为零, 说明辅料对其测定无干扰。

3.4.2 线性关系考察 精密称取在 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的水飞蓟宾对照品 7.5 mg, 精密称定, 至 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇适量, 于 50~55 $^{\circ}$ C 水浴中加热 10 min, 放冷, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 分别精密吸取续滤液 1, 2, 5, 7, 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 分别加 1.5% 十二烷基硫酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 按上述方法测定吸收度, 以浓度对吸收度进行线性回归, 得回归方程为 $Y = 0.0396X + 0.033$, $r = 0.9995$, 说明浓度在 3.1~31.0 μ g \cdot mL⁻¹ 之间, 线性关系良好。

3.4.3 精密度实验 取水飞蓟宾对照品适量, 精密称定, 加无水乙醇溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.15 mg 的溶液, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含 15 μ g 的对照品溶液, 照紫外-可见分光光度法^[3], 在 288 nm 的波长处分别测定吸光度, 重复测定 5 次, 测得样品吸收

度相对标准偏差 RSD= 0.75%。

3.4.4 稳定性实验 取已知浓度(15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的对照品溶液,照紫外-可见分光光度法^[3],分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 测定其吸光度, RSD= 0.94%。说明本品在 8 h 内测定结果基本稳定。

3.4.5 回收率实验 取适量水飞蓟宾对照品适量,精密称定,加无水乙醇溶解并稀释制成 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,精密量取 1, 2, 4 mL 对照品溶液,分别加入 100 mL 量瓶中,分别加入一定处方比例的辅料,振摇,使辅料充分吸附药物,加入 1.5% 十二烷基硫酸钠溶液稀释至刻度,摇匀,每个平行做 3 份,按以上确定的条件进行测定,结果见表 2。

表 2 水飞蓟宾加样回收率测定结果数据表

试验次数	加入量 (mg)	检出量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.10	0.096 4	96.40		1
2	0.10	0.098 2	98.20		
3	0.10	0.100 5	100.50		
4	0.20	0.199 5	99.75	99.07	1.63
5	0.20	0.197 3	98.65		
6	0.20	0.201 2	100.60		
7	0.40	0.395 2	98.80		
8	0.40	0.405 4	101.33		
9	0.40	0.389 6	97.38		

3.5 与原制剂益肝灵片溶出度的比较 取益肝灵片(批号为 20050121, 20050409, 20050511),依据 3.1 操作方法测定,结果表明 3 批样品在 45 min 的平均溶出累积释放百分率分别为 78%, 80%, 79.8%。益肝灵分散片与原制剂益肝灵片的溶出度比较结果表明,益肝灵分散片溶出速率较益肝灵片快,但在 60 min 时间点,二者的累积溶出总量基本相当。见图 2。

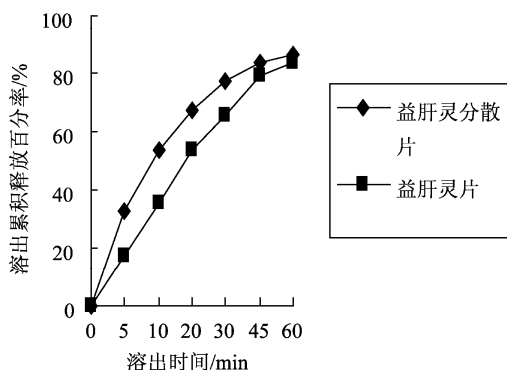


图 2 益肝灵分散片与益肝灵片溶出度曲线比较

4 含量测定^[9]

4.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX RX-C18(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(42: 58: 1); 检测波长 288 nm; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。理论塔板数按水飞蓟宾的双峰计算均应不低于 1 500。

4.2 对照品溶液的制备 取水飞蓟宾对照品适量,加无水乙醇溶解并稀释制成每 1 mL 含 70.0 μg 的溶液,即得。

4.3 供试品溶液的制备 取本品,研细,取约 45 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇适量,于 50~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min,放冷,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过,取续滤液,即得。

4.4 阴性对照溶液制备 按处方比例及其制备工艺制得缺水飞蓟宾的空白制剂,再按供试品溶液制备方法制备并测定,结果空白溶液在与水飞蓟宾对照品相同保留时间处未显明显色谱峰,说明水飞蓟宾的测定无干扰。(见图 3)。

4.5 线性关系考察 取干燥至恒重的水飞蓟宾对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成每 1 mL 含 256 μg 的溶液。分别精密吸取 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL 溶液至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取上述溶液各 5 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,以对照品进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明,水飞蓟宾在 0.128~ 1.280 μg 范围内线性良好。其回归方程为 $Y= 2\ 463.4X - 33.854$, $r= 0.999\ 7$ 。

4.6 精密度试验 取同一批样品(批号 050907)按正文方法制成供试品溶液,精密吸取同一供试品溶液,在所确定的 HPLC 条件下,进样 5 μL ,重复进样 5 次, RSD= 0.79%。

4.7 稳定性试验 取同一批样品(批号 050907)按正文方法制成供试品溶液,精密吸取同一供试品溶液 5 μL ,分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,依法测定,结果 RSD= 1.62%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

4.8 重复性试验 精密称取样品(批号 050907) 5 份,按“供试品溶液的制备”方法制备供试品溶液。按上述色谱条件进行测定,以外标一点法计算水飞蓟宾的含量,结果平均含量 27.138 mg/片, RSD= 0.24%,说明该方法可重复性良好。

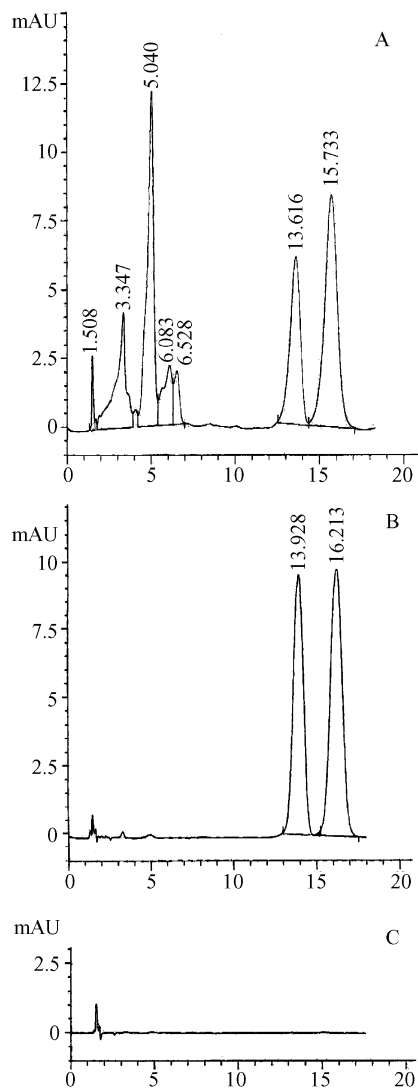


图 3 益肝灵分散片的 HPLC 色谱图

A. 益肝灵分散片样品图; B. 水飞蓟宾; C. 阴性对照

4.9 回收率试验 取已知含量($135.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)的样品(批号 050907) 5 片, 研细, 取约 0.023 g, 精密称定, 平行称取 5 份, 分别加入一定量的水飞蓟宾对照品, 在所确定的 HPLC 条件下进行测定, 以外标一点法计算水飞蓟宾的含量, 结果见表 3。

表 3 水飞蓟宾加样回收率试验

试验号	取样量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测出量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.022 98	3.12	3.0	6.093	99.1		
2	0.022 03	2.99	3.0	6.017	100.8		
3	0.022 92	3.11	3.0	6.122	100.3	100.12	0.89
4	0.023 07	3.13	3.0	6.161	101.1		
5	0.023 95	3.25	3.0	6.23	99.3		

4.10 样品测定结果 按正文方法测定水飞蓟宾的含量, 3 批样品的含量分别为 26.94 mg/片, 26.74 mg/

片, 27.05 mg/片。暂定本品每片含水飞蓟宾($\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$) 应不得少于 24.0 mg。

5 讨论

5.1 溶出度 本品为分散片, 是近年来热门的新剂型, 具有在水中迅速崩解分散均匀的特点, 在实验过程中通过对溶出介质、体积、转速、滤膜、溶出度均一性试验(批内)、重复性试验(批间), 与原制剂的对比试验等溶出度研究试验的全面分析, 制定了本文的溶出度测定方法。在该溶出度检查方法的试验摸索中, 因溶出样品的浓度有差异, 故在以上试验中多采用标准曲线测定计算。为便于溶出度检查中样品的测定, 采用外标一点法测定即可。

5.2 含量测定 本品为菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* L Gaertn 干燥果实中提取的水飞蓟素加工制成的分散片, 选用 HPLC 法测定水飞蓟宾含量作为本制剂质量控制的含量测定指标之一。在供试品溶液的制备中, 考察了提取溶剂, 提取方式及提取时间, 最终确定以无水乙醇水浴加热溶解 10 min 提取效果完全, 稳定性良好, 且操作简单, 易于掌握。据文献报道, 水飞蓟宾的含量测定多选用甲醇-水-冰醋酸为流动相, 比较不同比例流动相对分离的影响, 结果显示以甲醇-水-冰醋酸(42: 58: 1) 为流动相, 水飞蓟宾的分离效果好, $R > 1.5$, 且阴性无干扰, 回收率达到 100.12%, 准确度高, 可作为本制剂质量控制的含量测定指标。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 第八册, 1993: 154.
- [2] 刘本亮, 杨锡. 薄层扫描法测定益肝灵胶囊中水飞蓟素的含量[J]. 中成药, 1999, 21(4): 180.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 31, 28.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 73.
- [5] 陈大为, 陈星灿, 范晓文, 等. 水飞蓟素(益肝灵)片剂溶出速度的研究[J]. 中成药, 1992, 14(8): 3-5.
- [6] 李刚, 盛维强. 国产与进口水飞蓟素片的溶出度研究[J]. 药学实践杂志, 2000, 18(4): 218.
- [7] 曾翠梅, 凌志敏. 益肝灵分散片溶出度考察[J]. 现代医药卫生, 2006, 22(22): 3523-3525.
- [8] 王小平, 杨银盛, 周铁文. 高效液相色谱法测定益肝灵分散片中水飞蓟宾的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2488-2489.