

复方甘草酸苷片的溶出度研究

田莉^{1a}, 高晓黎^{1b,2*} (1.新疆医科大学, a.中医学院, b.药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆特丰药业股份有限公司, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立复方甘草酸苷片三组分的体外溶出度测定方法。方法 浆法, 蒸馏水为溶出介质, 用 HPLC 检测, 计算累积溶出百分率, 提取溶出参数(T50, Td, m)进行统计分析, 并采用相似因子法评价试验药品和进口对照药品溶出度的相似程度。结果 两种制剂中三组分的溶出参数均无差异($P>0.05$), 相似因子 f_2 分别为 81.3, 75.2, 77.3。结论 本研究建立的溶出度测定方法简便、准确、重复性好, 可用于复方甘草酸苷片的质量控制。两种制剂的体外溶出特性相似, 提示试验药品的生产工艺稳定, 可靠。

关键词: 复方甘草酸苷片; 高效液相色谱法; 溶出度; 相似因子法

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)06-0471-04

Study on the Dissolution of Compound Glycyrrhizin Tablets

TIAN Li^{1a}, GAO Xiaoli^{1b,2*} (1. Xinjiang Medical University, a. College of Traditional Chinese Medicine, b. College of Pharmacy, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Tefeng Pharmaceutical Co. Ltd., Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the dissolution method for the three compositions of compound glycyrrhizin tablets. **METHODS** According to Ch.P (2005) dissolution method II and using distilled water as the dissolution medium. The dissolution of compound glycyrrhizin tablet was determined by HPLC. The parameters(T50, Td, m)obtained from the dissolution tests were analysed. Degree of similarity of the dissolution was assessed using trial drugs and controlled drug. **RESULTS** There were no significant differences in dissolution parameters between trial drugs and controlled drugs($P>0.05$). The dissolution of the three compositions of trial drugs was similar to controlled drug. The similar factor was 81.3, 75.2 and 77.3, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and well reproducible. It can be used as a reliable method for the quality control of compound glycyrrhizin tablets. The dissolution characters of trial drugs similar with controlled drugs. The results show that the technology of producing trial drugs was stable and reliable.

KEY WORDS: compound glycyrrhizin tablets; HPLC; dissolution; similar factor

复方甘草酸苷片(商品名: 美能)是由甘草酸单铵盐, 甘氨酸, DL-蛋氨酸组方的复方制剂, 主要用于治疗各型病毒性肝炎和肝硬化, 疗效确切, 且无明显不良反应。目前, 美能在日本作为慢性肝炎的标准治疗药物长期、广泛应用于临床^[1]。市售产品美能的质量标准中 3 个主成分甘草酸单铵盐, 甘氨酸, DL-蛋氨酸的含量测定分别采用 HPLC, 薄层色谱法和滴定法, 无溶出度检查项, 其中甘草酸易溶于热水, 难溶于冷水, 体内生物利用度低, 鉴于此, 本试验建立了 HPLC 测定复方甘草酸苷片中三组分的溶出度, 并将国产制剂与美能进行溶出度对比, 为该制剂的处方工艺研究和质量标准制定提供实验依据。

1 仪器与材料

ZRS-8G 智能溶出仪(天津大学无线电厂); Agilent HPLC 仪(Chemstation 工作站); GB11240-80 型恒温水浴锅(北京市医疗设备厂); pHs-3 型精密 pH 计(上海精科雷磁仪器厂)。美能(日本米诺发源制药株式会社生产, 批号: 90902B, 规格: 每片含甘草酸苷 25 mg, 甘氨酸 25 mg, DL-蛋氨酸 25 mg); 复方甘草酸苷片(新疆特丰药业股份有限公司, 批号: 20050115, 规格: 每片含甘草酸苷 25 mg, 甘氨酸 25 mg, DL-蛋氨酸 25 mg); 甘草酸单铵对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0731-200205, 含量 90.8%, 色谱纯); 甘氨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 140689.200401, 供含量测定用); DL-蛋氨酸对照品(Sigma-Aldrich 公司, 批号: 058H0123, 含量>99%); 乙腈, 为色谱纯, 2,4-二

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技攻关(含重大专项)和重点项目计划(200733146-4); 乌鲁木齐市科学技术计划项目(Z041401)

作者简介: 田莉, 女, 博士生 *通信作者: 高晓黎, 女, 教授, 博士生导师 Tel: (0991) 4312411 E-mail: gxli@tefeng.com

硝基氟苯(2, 4-dinitrofluoro- benzene, DNFB)及其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2]

ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.025 mol·L⁻¹ NaAc(41 : 59); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 双波长检测: λ_{甘草酸}=251 nm, λ_{氨基酸}=360 nm; 进样量 20 μL。

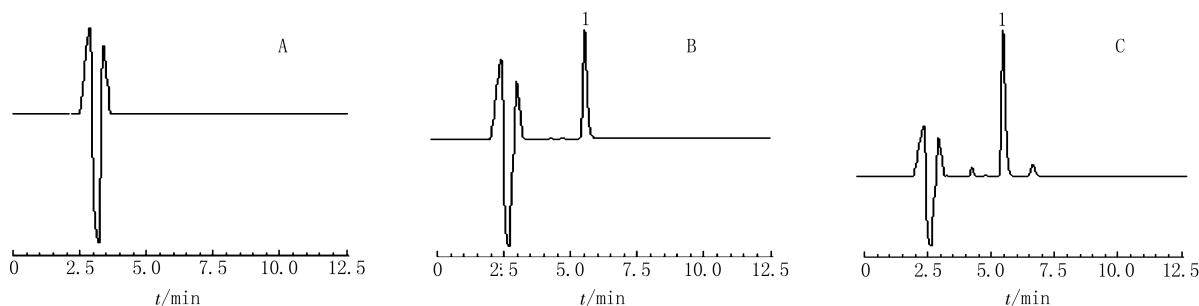


图1 甘草酸单铵盐高效液相色谱图

A-空白样品; B-甘草酸单铵对照品; C-供试品; 1-甘草酸单铵盐

Fig 1 Representative HPLC chromatograms of glycyrrhizin

A-blank excipients; B-sandard; C-sample; 1-glycyrrhizin

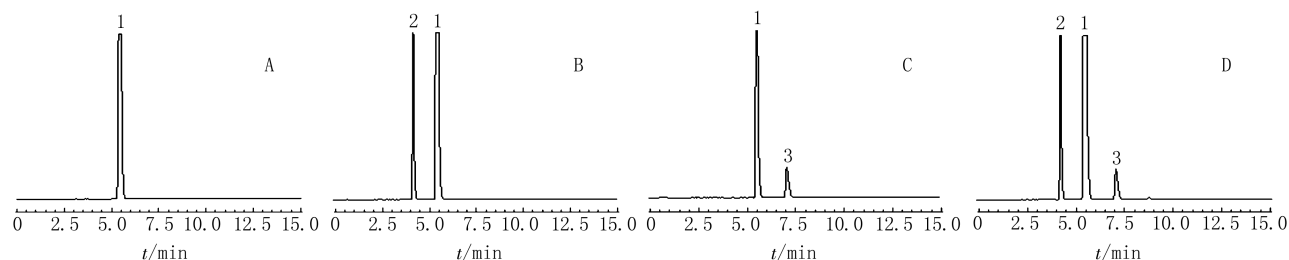


图2 甘氨酸、DL-蛋氨酸 HPLC 图

A-空白样品; B-甘氨酸对照品; C-DL-蛋氨酸对照品; D-供试品; 1-DNFB; 2-甘氨酸; 3-DL-蛋氨酸

Fig 2 Representative HPLC chromatograms of glycine and DL-methionine

A-blank excipients; B.glycine standard; C. DL-methionine sample; 1-DNFB ; 2-glycine; 3- DL-methionine

2.3 标准曲线的制备

2.3.1 甘草酸单铵盐标准曲线的制备 精密称取甘草酸单铵对照品适量, 以 50% 甲醇配制成浓度为 0.04, 0.10, 1.01, 5.06, 25.30, 50.60, 101.2, 202.4, 303.6 μg·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 分别取 20 μL 进样测定, 以浓度对峰面积回归, 得回归方程: $Y = 15\,261 X - 1\,152.8$, $r = 0.999\,9$, 线性范围为 0.04~303.6 μg·mL⁻¹。

2.3.2 甘氨酸、DL-蛋氨酸标准曲线的制备 精密称取甘氨酸、DL-蛋氨酸对照品适量, 以蒸馏水分别配制成约 600 μg·mL⁻¹ 溶液, 取此液适量, 依条件加入 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 和 2% DNFB 进行衍生^[2], 以 KH₂PO₄ 缓冲液稀释至刻度, 得贮备液。再以 KH₂PO₄ 缓冲液稀释, 配成甘氨酸浓度为 0.014, 0.97, 24.19, 72.58, 96.77, 145.15, 193.54 μg·mL⁻¹

2.2 系统适用性

在上述色谱条件下, 以空白辅料溶液、对照品溶液和供试品溶液分别进样测定, 甘草酸单铵盐的保留时间为 5.4 min, 色谱图见图 1; 甘氨酸、DL-蛋氨酸及衍生剂 DNFB 的保留时间分别为 4.3, 7.2 和 5.6 min, 色谱图见图 2。理论板数以甘草酸单铵盐峰, 甘氨酸峰、DL-蛋氨酸峰计分别为 5736, 16114, 9021, 分离度均大于 2.0。

的对照溶液, DL-蛋氨酸浓度为 0.048, 0.48, 9.50, 95.04, 190.08, 237.6 μg·mL⁻¹ 的对照溶液, 进样测定, 以浓度对峰面积回归, 得回归方程。甘氨酸: $Y = 134\,552 X - 30\,088$, $r = 0.999\,8$, 线性范围为 0.014~193.54 μg·mL⁻¹; DL-蛋氨酸: $Y = 134\,552 X - 30\,088$, $r = 0.999\,7$, 线性范围为 0.048~237.6 μg·mL⁻¹。

2.4 精密度试验

分别取甘草酸单铵盐、甘氨酸和 DL-蛋氨酸的同一浓度供试品溶液(50 μg·mL⁻¹), 均平行 6 份样品进行测定, 记录峰面积。三组分的日内精密度 RSD 分别为: 1.06%, 0.85%, 1.29%; 连续 5 d 重新处理样品进行测定, 三组分的日间精密度 RSD 分别为 1.88%, 1.61%, 1.91%。

2.5 回收率试验

分别精密称取甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸适量,按处方加入其他成分和辅料,配成低、中、高3种不同浓度的溶液,均平行3份,同时分

表1 甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸回收率试验测定结果

Tab 1 Results of recovery for glycyrrhizin, glycine and DL-methionine

	已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	RSD/%
甘草酸单铵盐	20.84	18.216	39.13 \pm 0.03	100.41 \pm 0.14	0.14
	20.84	22.264	43.76 \pm 0.19	102.96 \pm 0.85	0.82
	20.84	26.312	46.89 \pm 0.11	98.99 \pm 0.42	0.43
甘氨酸	28.12	10.08	38.21 \pm 0.17	100.17 \pm 0.17	1.67
	28.12	20.15	48.54 \pm 0.17	101.36 \pm 0.17	0.84
	28.12	10.18	69.21 \pm 0.09	101.95 \pm 0.09	0.23
	27.62	10.18	37.81 \pm 0.17	100.01 \pm 1.69	1.68
DL-蛋氨酸	27.62	20.37	48.35 \pm 0.25	101.77 \pm 1.22	1.20
	27.62	40.74	67.74 \pm 0.12	98.49 \pm 0.12	0.28

2.6 稳定性试验

分别取三组分的供试品溶液于24 h内每间隔2 h测定1次,结果甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸峰面积的RSD分别为0.84%,0.82%,0.37%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 灵敏度试验

分别取三组分的对照品溶液进行不断稀释,按信噪比S/N=3计,甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸的最低检测限分别为2.02,0.28,0.96 ng;按信噪比S/N=10计,甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸的定量限分别为4.04,1.16,1.24 ng。

2.8 溶出度测定

2.8.1 溶出介质的选择 按中国药典2005版^[3]对溶出度介质的一般要求,分别选择蒸馏水、磷酸盐缓冲液(pH 7.4)和0.1 mol·L⁻¹ HCl盐酸溶液为溶出介质,转速100 r·min⁻¹,45 min时取样过滤,取滤液直接测定甘草酸单铵盐的溶出度;另取滤液2 mL,依条件进行衍生处理后^[2],进样测定甘氨酸和DL-蛋氨酸溶出度。结果表明,甘草酸单铵盐在蒸馏水和盐酸溶液中溶出度接近,45 min时溶出度均超过80%,磷酸盐缓冲液中溶出度低于70%。甘氨酸、DL-蛋氨酸在3种介质中45 min时溶出度均超过80%。即以水,稀酸为溶出介质时,溶出情况较好,鉴于该制剂为胃溶片,主要在胃中溶出,在小肠中吸收,综合考虑以蒸馏水为溶出介质。

2.8.2 转速的选择 甘氨酸、DL-蛋氨酸易溶于水,45 min时溶出度均超过80%,现以甘草酸单铵盐进行转数的筛选。浆法,500 mL蒸馏水为溶出介质,转速分别为50,75,100,125,150 r·min⁻¹。分别

配制对照品溶液,进样测定,计算回收率,结果见表1。

于10,20,30,45,60,90 min取溶液5 mL(同时补充同温度等体积的溶出介质),过滤后直接进样测定。结果表明,以100 r·min⁻¹作为溶出转数即可满足要求,小于100 r·min⁻¹时,甘草酸单铵盐累积溶出百分率偏低,大于100 r·min⁻¹各时间点的溶出百分率无显著性差异,结果见图3。

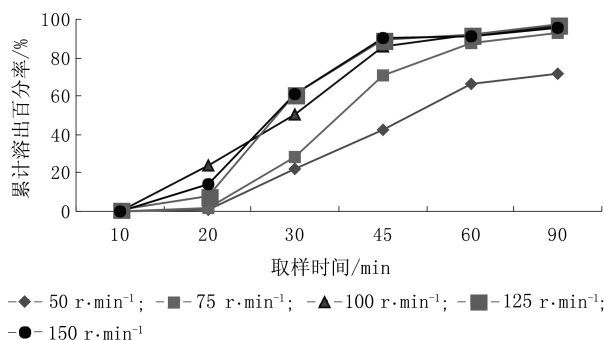


图3 不同转速条件下甘草酸单铵盐的溶出曲线

Fig 3 Dissolution curve of glycyrrhizin of compound glycyrrhizin tablets in different revolution

综上所述,复方甘草酸苷片溶出度实验方法为浆法,溶出介质为500 mL蒸馏水,温度(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,转速100 r·min⁻¹。

2.8.3 溶出度的测定 分别取美能和3批复方甘草酸苷片各6片,依法操作,分别于10,20,30,45,60 min时取样5 mL(同时补充同温度等体积的溶出介质),依条件处理后,分别进样20 μL ,记录色谱峰,并以峰面积计算3种药物的累积溶出百分率,并用电子表格Excel^[4]计算样品的威布尔(Weibull)分布参数T50, Td, m,结果见表2,并对3种成分的溶出参数,进行方差分析和t检验,结果见表3。三组分后溶出参数方差齐,t检验无显著性差异($P>0.05$)。

表 2 复方甘草酸苷片三组分各时间点累积溶出百分率和溶出参数(%，n=6， $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Accumulated dissolution rates and dissolution parameters of compound glycyrrhizin tablets (%，n=6， $\bar{x} \pm s$)

样品名称		美能			复方甘草酸苷片		
		甘草酸单铵盐	甘氨酸	DL-蛋氨酸	甘草酸单铵盐	甘氨酸	DL-蛋氨酸
取样时间/min	10	0.23±0.17	0.60±0.66	0.15±0.36	0.59±0.25	0.43±0.35	0.00±0.00
	20	27.60±5.23	25.42±6.47	22.93±7.06	23.61±4.67	28.28±5.34	22.66±6.75
	30	68.25±9.09	69.85±5.05	73.73±5.80	66.80±3.38	75.36±2.08	72.85±5.12
	45	88.20±4.38	89.61±2.47	93.16±1.48	87.32±2.44	88.40±2.91	88.70±3.31
	60	95.37±2.68	93.94±1.86	97.69±2.26	93.35±2.59	91.88±1.16	93.85±1.42
溶出参数	T50	30.65±0.92	30.32±0.53	32.81±0.30	31.04±1.07	30.88±1.28	32.38±0.72
	Td	34.00±1.09	34.23±1.54	34.47±0.61	34.06±1.06	33.41±0.26	34.79±0.33
	m	3.59±1.33	3.79±0.37	6.07±1.11	3.48±0.18	3.60±0.43	6.28±0.15

表 3 复方甘草酸苷片三组分溶出参数的方差分析和 t 检验结果

Tab 3 Analytical results of variance and t-test on the dissolution parameters of compound glycyrrhizin tablets

成分名称	方差齐性检验		t 检验		
	F 值	P 值	t 值	P 值	
T50	甘草酸单铵盐	1.334 3	0.759 3	0.676 0	0.514 4
	甘氨酸	5.630 8	0.080 9	0.902 0	0.388 3
	DL-蛋氨酸	5.842 1	0.075 2	1.379 4	0.197 8
Td	甘草酸单铵盐	1.005 6	0.995 2	0.023 4	0.981 8
	甘氨酸	2.620 8	0.313 9	0.956 1	0.361 5
	DL-蛋氨酸	1.393 1	0.724 9	1.330 3	0.213 0

2.9 体外溶出的相似性评价

采用 FDA 推荐使用的相似因子法评价固体剂试验药品和对照药品的体外溶出度的差异^[5]。相似因子 f₂ 计算公式如下，当 50 ≤ f₂ ≤ 100，则表示两制剂的溶出度相似。

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Rt: 参比样品 t 时的溶出度; Tt: 试验样品 t 时的溶出度, n: 试验取样点

结果两制剂中甘草酸单铵盐、甘氨酸、DL-蛋氨酸的相似因子分别为 81.3, 75.16, 77.25, 根据相似性原理, 可认为两制剂的溶出度相似。

3 讨论

本试验提供了一个可行的测定及评价复方甘草酸苷片溶出度的方法, 首次建立了在同一系统适用性条件下使用双波长对复方甘草酸苷片中 3 种主成分进行溶出度检测, 操作简便、准确、重复性好, 各组分分离完全, 与美能的分析方法相比更具先进性和可靠性, 可有效控制复方甘草酸苷片的质量。

根据对三组分溶出参数的统计分析和相似因子 f₂ 计算结果表明: 试验药品与对照药品的溶出参数均无差异, 溶出度相似, 从而进一步证明, 试验药品的处方合理, 工艺稳定, 溶出度符合中国药典 2005 版的要求。

REFERENCES

- [1] HIROMITSU, KUMADA. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Oncology, 2002, 62, (1): 94.
- [2] TIAN L, GAO X L, YUN Q. Determination of three kinds of component in compound glycyrrhizin tablet by RP-HPLC [J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2005, 28(1): 27-29.
- [3] Ch.P(2005) Vol II(中国药典 2005 年版.二部) [S]. 2005: Appendix XC.
- [4] LI Z D. Data calculation in dissolution test by using Excel software [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2004, 19(5): 198-199.
- [5] XIA J H, LIU C X. Statistics evaluation and analysis about dissolution of solid preparations in vitro [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2000, 35 (2): 130-131.

收稿日期: 2008-09-01