

HPLC 测定二维芦丁片复方制剂中芦丁的溶出度和含量

文春梅¹, 郑舒娴¹, 王建^{2*} (1.浙江工业大学, 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定二维芦丁片中芦丁溶出度和含量的方法。方法 溶出度测定以水(含 0.5% SDS)为溶出介质, 浆法, 转速为 75 r·min⁻¹, 45 min 取样, 取样后采用 HPLC 测定; 含量测定采用 Thermo C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液, 用磷酸调节 pH 值至 4.4)-乙腈(80:20)为流动相, 检测波长为 254 nm。结果 芦丁在 2.26~22.56 μg·mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好($r=1.000\ 0$), 平均回收率为 98.2%(RSD=0.4%), 溶出液稳定。3 批样品在 45 min 时平均溶出度均>75%, 并且有较好的均一性; 含量测定线性关系良好, 芦丁回收率为 100.6%(RSD=0.4%, $n=9$)。结论 该法简单、准确、重复性好, 可用于二维芦丁片中芦丁的溶出度及含量的测定。

关键词: 二维芦丁片; 芦丁; 溶出度; 含量; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)02-0188-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.02.008

引用本文: 文春梅, 郑舒娴, 王建. HPLC 测定二维芦丁片复方制剂中芦丁的溶出度和含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 188-192.

Determination of Dissolution and Content of Two-dimensional Rutin Tablets by HPLC

WEN Chunmei¹, ZHENG Shuxian¹, WANG Jian^{2*} (1.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine dissolution and content of rutin in Two-dimensional Rutin tablets by HPLC. **METHODS** The dissolution medium of determination of dissolution was water (containing 0.5% SDS). Apparatus 2 was used with 75 r·min⁻¹. The dissolution medium was taken and analyzed by HPLC at 45 min. Determination of content was measured using a Thermo C₁₈ column. The mobile phase was treated with phosphate buffer (0.1 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution and adjusted to pH 4.4 with phosphoric acid) - acetonitrile (80:20). The detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** Dissolution determination: it showed that standard curve was linear in the range of 2.26~22.56 μg·mL⁻¹ ($r=1.000\ 0$). The average recovery was 98.2% (RSD=0.4%) for rutin. The dissolution of Two-dimensional Rutin tablets from three batches were >75%. Determination of content: the method for determination of rutin had a good linearity, and the recovery was 100.6%(RSD=0.4%, $n=9$). **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and reproducible, and it can be used for the determination of dissolution and content of Two-dimensional Rutin tablets.

KEY WORDS: Two-dimensional Rutin tablets; rutin; dissolution; content; HPLC

芦丁具有降低毛细血管异常通透性和脆性的作用, 临床主要用于高血压病的辅助治疗。二维芦丁片是由维生素 C、维生素 B₆、芦丁制成的复方制剂, 用于高胆固醇血症及动脉粥样硬化治疗。亚油酸维生素 E 胶丸/二维芦丁片由杭州华东医药集团五丰制药厂生产。目前执行国家药品监督管理局国家药品标准试行 WS-10001-(HD-1263)-2002, 国内外药典(中国药典、USP、BP、EP 和 JP)均未见收载。试行标准中采用 UV 法测定芦丁含量, 专属性差, 前处理过程产生的误差很大, 因此本实验将芦丁的含量测定方法由 UV 法改为 HPLC; 试行标准二维芦丁片中未设溶出度检查

项, 考虑到芦丁为水难溶性药物, 因此本实验研究了芦丁的溶出度检查方法。本实验参照中国药典 2015 年版曲克芦丁的液相色谱条件, 和相关的含量^[1-3]和溶出度^[4-5]文献, 研究建立了 HPLC 测定二维芦丁片中芦丁溶出度和含量的方法, 并在标准中增订了芦丁的溶出度检查, 将芦丁的含量测定方法由 UV 法改为了 HPLC, 经方法学试验, 方法简便、可行, 可用于本品的质量控制。

1 仪器与试剂

LC-20AD 液相色谱仪(日本岛津, 包括在线真空脱气机, 二元泵, 自动进样系统等); AT7 型溶出仪(瑞士 SOTAX, 采用针式取样方式); Hanson

基金项目: 国家药品标准提高研究项目(食药监药化管便函[2015]1057 号)

作者简介: 文春梅, 女, 硕士生 Tel: 13735458046 E-mail: 2529449568@qq.com *通信作者: 王建, 男, 博士, 主任药师, 博导 Tel: (0571)87180340 E-mail: wangjianhw2000@aliyun.com

在线过滤器(孔径 10 μm)。

水为蒸馏水; 乙腈为色谱纯; 磷酸二氢钠、戊烷磺酸钠均为分析纯; 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 10080-201409, 含量: 91.1%); 二维芦丁片及空白辅料(杭州华东医药集团五丰制药厂, 规格: 10 mg, 批号: 16062001, 16011901, 16062202)。槲皮素对照(中国食品药品检定研究院, 批号: 10081-201509, 纯度为 98.6%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

二维芦丁片为复方制剂, 且芦丁规格小, 因此采用专属性强的 HPLC 测定本品中芦丁的溶出度和含量。

2.1.1 含量测定色谱条件 色谱柱: Thermo C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液(0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液, 用磷酸调节 pH 值至 4.4)-乙腈(80 : 20)为流动相, 检测波长为 254 nm; 流速: 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 10 μL 。

2.1.2 溶出度色谱条件 进样量: 20 μL , 其他条件同含量测定色谱条件。

2.2 溶出度测定

2.2.1 二维芦丁片在 4 种溶出介质中的溶出曲线和溶出条件的选择 取本品, 照溶出度与释放度测定法(中国药典 2015 年版通则 0931 第二法^[6]), 分别以 4 种溶剂[分别为水、pH 1.2 的盐酸溶液、2 mol \cdot L $^{-1}$ 醋酸溶液(pH 4.0)、pH 6.8 磷酸盐缓冲液, 4 种溶出介质中均含 0.5% SDS]900 mL 为溶出介质, 转速为 75 r \cdot min $^{-1}$, 依法操作, 经 5, 10, 15, 30, 45, 60 min 时, 取溶出液 5 mL, 作为供试品溶液, 并及时补足溶出介质。另精密称取芦丁对照品 11 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使芦丁溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件测定, 取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算每片芦丁的溶出量, 结果见图 1。

通过上述研究, 确定溶出度检查的条件为: 桨法, 以水(含 0.5% SDS)900 mL 为溶出介质, 转速为 75 r \cdot min $^{-1}$, 45 min 取样。

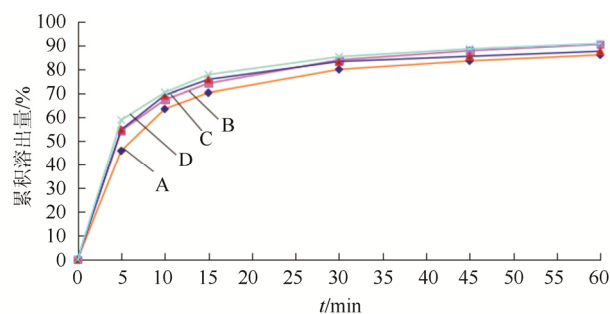


图 1 二维芦丁片在 4 种溶出介质中的溶出曲线图

A-pH 1.2; B-pH 4.0; C-pH 6.8; D-水。

Fig. 1 The dissolution profile of Two-dimensional Rutin tablets in four dissolution media

A-pH 1.2; B-pH 4.0; C-pH 6.8; D-water.

2.2.2 溶出度测定方法 取本品, 照溶出度与释放度测定法(中国药典 2015 年版通则 0931 第二法), 以 0.5% SDS 900 mL 为溶出介质, 转速 75 r \cdot min $^{-1}$, 依法操作, 经 45 min 时, 取溶液 10 mL, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。另取芦丁对照品约 11 mg, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件, 取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算每片芦丁($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)的溶出量。限度为标示量的 75%, 应符合规定。

2.2.3 方法学试验

2.2.3.1 线性关系 精密称取芦丁对照品适量, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取适量, 加水(含 0.5% SDS)稀释制成系列浓度溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件测定。结果回归方程: $A = -1\,226.499\,3 + 18\,590.399\,6C$, 相关系数 $r = 1.000\,0$ 。结果表明, 对照品溶液浓度在 2.26~22.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积有良好的线性关系。

2.2.3.2 溶出度其他成分的干扰试验 按处方比例, 制成不含芦丁的空白样品, 取适量, 加水(含 0.5% SDS)适量, 超声振荡, 并稀释至规定浓度, 摇匀。滤过, 取滤液照“2.1.2”项下色谱条件测定, 结果表明其他成分对芦丁的溶出度测定无干扰, 见图 3。

2.2.3.3 回收率试验 按处方比例, 分别精密称取相当于样品标示量的 50%, 70%, 100% 的芦丁对照品及相应量的空白辅料, 加甲醇适量, 超声振

荡使芦丁溶解，并加水(含 0.5% SDS)至规定浓度，摇匀，滤过，按“2.1.2”项下色谱条件测定，对本法的回收率进行考察。结果见表 1。可见本法的回收率较高，可用于溶出度的测定。

表 1 溶出度的回收率测定结果(n=9)

Tab. 1 The results of recovery for dissolution(n=9)

模拟浓度/ %	加入量/ mg	测定量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
50	6.05	5.94	98.24		
	6.12	5.96	97.39		
	6.03	5.94	98.52		
70	9.45	9.29	98.27	98.2	0.4
	9.39	9.28	98.79		
	9.43	9.28	98.44		
100	12.64	12.39	98.01		
	12.58	12.36	98.25		
	12.62	12.37	98.00		

2.2.3.4 溶液的稳定性 取供试品溶液，按“2.1.2”项下色谱条件测定，于 0, 2, 4, 8 h 测定，结果 RSD 为 1.3%，溶液在 8 h 内稳定。

2.2.4 样品的溶出度测定结果 取杭州华东医药集团五丰制药厂样品 3 批，照溶出度测定法(中国药典 2015 年版通则 0931 第二法)，以水(含 0.5%SDS)为溶出介质，转速为 75 r·min⁻¹，依法操作，在 5, 10, 15, 30, 45, 60 min 时，分别取溶液 10 mL，滤过，并及时在操作容器中补充上述溶剂 10 mL。另精密称取芦丁对照品 11 mg，置 20 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使芦丁溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 2 mL，置 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件测定，取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算每片的溶出量。

结果见图 2~3。根据溶出曲线试验结果，将取样时间定为 45 min，限度定为 75%。

2.3 含量测定

2.3.1 溶液的配制 精密称取芦丁对照品约 10 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇约 10 mL，超声使溶解，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为含量测定的对照品溶液；取本品 20 片，精密称定，研细，取细粉适量(约相当于芦丁 50 mg)，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声使芦丁溶解，用甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，

精密量取续滤液 5 mL，置 25 mL 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，作为含量测定的供试品溶液。

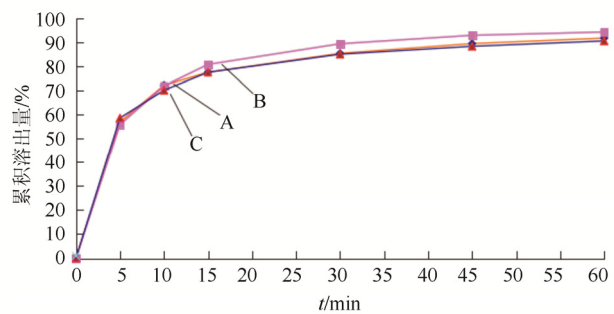


图 2 3 批二维芦丁片的溶出曲线

A-16062001; B-16011901; C-16062202。

Fig. 2 Dissolution curves of two batches of Two-dimensional Rutin tablets.

A-16062001; B-16011901; C-16062202.

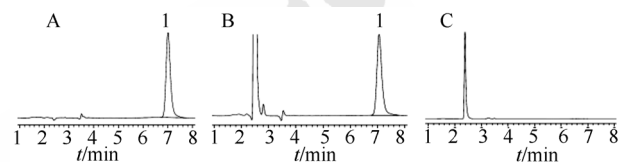


图 3 溶出色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液(批号: 16011901); C-空白样品溶液; 1-芦丁。

Fig. 3 Dissolution chromatogram

A-standard solution; B-sample solution(batch 16011901); C-blank; 1-rutin.

2.3.2 系统适用性试验 取芦丁对照品和槲皮素对照品各适量，加甲醇适量使溶解，用流动相稀释制成每 1 mL 中分别约含 0.2 mg 和 2 μg 的溶液，作为系统适用性溶液，取 10 μL 按“2.1.1”项下的色谱条件进行分析，记录色谱图，结果见图 4，芦丁峰与槲皮素峰的理论板数分别为 8 967, 9 521，芦丁峰与槲皮素峰之间的分离度为 35.75。

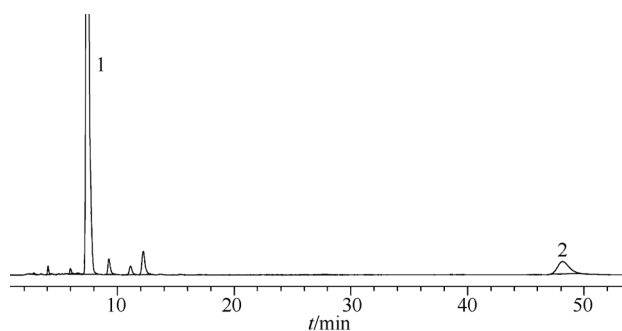


图 4 系统适用性试验色谱图

1-芦丁; 2-槲皮素。

Fig. 4 Chromatogram of system suitability test

1-rutin; 2-quercetin.

2.3.3 方法专属性试验

2.3.3.1 芦丁与槲皮素的分离 取“2.3.1”项下的系统适用性溶液 10 μL , 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 确定芦丁和槲皮素的保留时间, 考察两者之间的分离度, 结果见图 4。结果表明, 在上述色谱条件下, 芦丁与槲皮素完全分离。

2.3.3.2 强力破坏试验 分别取 5 份芦丁原料药和二维芦丁片细粉各适量, 其中 2 份分别加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.5 mL 和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 0.5 mL, 加入碱的那份放置 0.5 h 后中和, 加入酸的那份放置 1 h 后中和; 一份加 3% 过氧化氢溶液 0.5 mL, 放置 2 h; 另外 2 份分别在 105 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 3 h 和于强光下(4 500 lx)照射 5 d, 分别加甲醇适量, 超声使芦丁溶解, 用流动相稀释制成每 1 mL 中约含 0.2 mg 的溶液, 滤过, 取上述处理后的溶液各 10 μL 进样分析, 结果芦丁对强光、碱、氧化破坏基本稳定, 在酸、高温破坏下, 有降解产物产生, 产生的主要降解产物是槲皮素, 对主峰含量测定无干扰。

2.3.3.3 其他峰干扰 按二维芦丁片处方制备不含芦丁的缺味溶液, 进样, 记录色谱图。结果表明二维芦丁片中的辅料、维生素 C 和维生素 B6, 对芦丁的含量测定无干扰, 色谱图见图 5。

2.3.4 方法学试验

2.3.4.1 线性关系 精密称取芦丁对照品适量, 加甲醇适量, 超声使溶解, 用流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.04, 0.10, 0.20, 0.30 和 0.40 mg 的溶液。按“2.1.1”项下色谱条件测定。得线性方程为 $A=1.96\times 10^7C-1.7\times 10^3$, $r=1.000\ 0(n=5)$ 。结果表明, 芦丁在 0.04~0.40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性良好。

2.3.4.2 回收率试验 按处方比例, 分别精密称取相当于样品标示量的 80%, 100%, 120% 的芦丁对照品及相应量的空白辅料, 加甲醇适量, 超声使芦丁溶解, 并加流动相稀释至规定浓度, 摇匀, 滤过, 按“2.1.2”项下色谱条件测定, 对本法的准确度进行考察。结果见表 2。

2.3.4.3 仪器精密度试验 取批号为 16062001 的样品 6 份, 照确定的含量测定方法测定, 结果 RSD 为 0.6%。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品, 照确定的方法, 进样测定, 结果批号为 16062001, 16011901, 16062202 的 4 批

样品, 含量分别为 99.5%, 99.5%, 99.1%, 含量测定 HPLC 色谱图见图 5。

表 2 芦丁测定回收率测定结果($n=9$)

Tab. 2 The results of recovery for rutin($n=9$)

模拟浓度/ %	加入量/ mg	测定量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
80	17.06	17.03	99.83	100.6	0.4
	16.43	16.46	100.17		
	16.65	16.75	100.58		
100	20.25	20.43	100.91		
	20.56	20.68	100.59		
	20.46	20.65	100.92		
120	24.64	24.84	100.80		
	24.61	24.74	100.54		
	24.74	24.96	100.87		

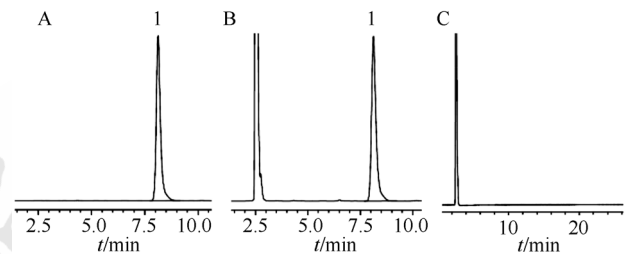


图 5 含量测定典型色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液(批号: 16011901); C-空白样品溶液; 1-芦丁。

Fig. 5 Typical chromatogram of content determination

A-standard solution; B-sample solution(batch 16011901); C-blank; 1-rutin.

3 讨论

3.1 芦丁在 4 种溶出介质中的溶解度和表面活性剂 SDS 浓度的选择

取芦丁原料药 10 mg, 置带塞三角瓶中, 分别加入 pH 1.2 盐酸缓冲液、pH 4.0 醋酸缓冲液、水和 pH 6.8 磷酸缓冲液 4 种溶出介质 250 mL, 振摇, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置 3 h, 其间每隔 0.5 h 取出振摇一次。结果芦丁在 4 种溶出介质均未完全溶解, 在水和 pH 4.0 醋酸缓冲液中的溶解度大于 pH 1.2 盐酸溶液中的溶解度, 在 pH 6.8 磷酸缓冲液中的溶解度最差。

因此在溶出介质中需添加表面活性剂 SDS。试验了在 4 种溶出介质中分别添加 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% 和 0.5% SDS, 结果添加 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% SDS, 芦丁在 4 种溶出介质均未完全

溶解；添加 0.5%SDS，芦丁在水和 pH 4.0 醋酸缓冲液中溶解完全，在 pH 1.2 盐酸溶液中未完全溶解，在 pH 6.8 磷酸缓冲液中的溶解较差。因此在溶出介质中添加 0.5%SDS。

3.2 溶出介质的选择

根据二维芦丁片在 4 种溶出介质中(pH 1.2 盐酸缓冲液，pH 4.0 醋酸缓冲液，水和 pH 6.8 磷酸缓冲液且均含 0.5%SDS)的溶出曲线，确定水(含 0.5% SDS)900 mL 为溶出介质最佳。

3.3 转速的选择

比较了浆法转速为 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 和转速为 $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的溶出度，结果表明，转速为 $50 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，溶出度低；转速为 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，45 min 可基本完全溶出。因此转速选择 $75 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

3.4 滤膜的吸附作用考察

水(含 0.5% SDS)为溶出介质的溶出液经滤膜过滤(津隆 MICRO PES 聚醚砜，水系， $0.45 \mu\text{m}$)，与离心过后的溶出液比较，HPLC 测定。经滤膜过

滤后峰面积为 139 117，离心后峰面积为 139 931，说明水(含 0.5% SDS)为溶出介质，滤膜对芦丁无吸附。

REFERENCES

- [1] ATTIA T Z. Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid mixture in their pure forms and combined dosage form [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016(169): 82-86.
- [2] MA J Y, ZHANG C X, ZHAO B T. Determination of Rutin tablets and Compound Rutin tablets from different manufacturers by RP-HPLC [J]. J Northwest Norm Univ(Nat Sci)(西北师范大学学报), 2010, 46(5): 74-76.
- [3] SUN Y H. Determination of vitamin C and rutin in Compound Rutin tablets by HPLC with dual-wavelength [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2012, 16(1): 30-32.
- [4] ZHANG P, CHEN R, WANG Y, et al. Study on the dissolution determination of Compound Rutin tablets [J]. Pharm Care Res(药学服务与研究), 2016, 16(3): 225-229.
- [5] SHI J M, LIN L. Study on dissolution method of Troxerutin tablets [J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报), 2012, 28(3): 251-254.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 121-123.

收稿日期: 2017-08-22
(本文责编: 曹粤锋)