

HPLC 法检测瑞巴派特片体外溶出度

庞武耀¹, 刘文²

1. 肇庆医学高等专科学校, 广东 肇庆 526020

2. 北京韩美药品有限公司, 北京 100176

摘要: 目的 建立瑞巴派特片体外溶出度 HPLC 检测方法及方法学验证。方法 溶出度试验采用桨法, 转速 50 r/min; 以水、pH 1.2 盐酸(含氯化钠)、pH6.0 枸橼酸-磷酸二氢钠缓冲液和 pH6.8 磷酸缓冲液为溶出介质, HPLC 法测定溶出量。结果 瑞巴派特在 5.533~221.334 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 专属性、精密度、准确度、溶液稳定性及耐用性等均良好。结论 本方法简单方便, 提高了瑞巴派特溶出度测定的专属性和准确性, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 瑞巴派特片; 耐用性; 体外溶出度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)07-1260-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.018

Development and Validation of dissolution *in vitro* for Rebamipide Tablets by HPLC

PANG Wuyao¹, LIU Wen²

1. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020, China

2. Beijing Hanmi Pharmaceutical Co., LTD, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To establish and evaluate a method for determining the dissolution of Rebamipide Tablets *in vitro*. **Methods** The paddle method was used for the dissolution test and the rotation rate was set at 50 r/min. Using water, pH 1.2 hydrochloric acid solution (containing sodium chloride), pH 6.0 Citrate - sodium dihydrogen phosphate buffer solution and pH 6.8 phosphate buffer solution as dissolution media. HPLC was used for the determination of dissolution quantity. **Results** There was a good linear relationship between the quality concentration of Rebamipide and peak area in the range of 5.533—221.334 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$). Specificity, precision, accuracy, solution stability and durability were all good. **Conclusion** The HPLC method is simple, which improve the specificity and accuracy of dissolution determination for rebamipide tablets, and it can be used for the quality control of the preparation.

Key words: Rebamipide Tablets; robustness test; dissolution *in vitro*; HPLC

瑞巴派特片是新型的抗胃溃疡病新药, 对各种急性胃炎和胃黏膜损伤具有良好的防治效^[1], 临床应用比较广泛。瑞巴派特片原研企业为浙江大家制药有限公司, 商品名为“膜固思达”。国内有多个厂家仿制生产该药。随着我国对仿制药一致性评价工作日益趋紧^[2], 瑞巴派特片的质量标准也必须与时俱进, 否则就会在“药物一致性研究”的大潮下被淘汰。目前瑞巴派特片质量标准中溶出度测定方法为紫外检测^[3], 由于 UV 法专属性不强, 且检测效率低下^[4], 很难满足溶出曲线评价工作的要求。

为保证瑞巴派特片中瑞巴派特溶出曲线测定的准确性和可靠性, 同时提高检测效率, 本文建立了高效、准确、快捷的瑞巴派特片体外溶出度 HPLC 检测方法, 并对瑞巴派特溶出曲线测定方法进行了方法学验证。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦 1260 HPLC 系列色谱仪; ZRS-8L 型智能溶出仪; Mili-Q 超纯水机。

收稿日期: 2017-11-13

第一作者: 庞武耀, 讲师, 硕士, 研究方向为新药开发与研究。Tel: (0758)2857607 E-mail: p51ishot@outlook.com

1.2 试剂

瑞巴派特对照品(美国 TLC 公司, 批号 1683-002A); 瑞巴派特原料(苏州天马医药集团有限公司; 批号 3A17160106); 瑞巴派特片(北京韩美药品有限公司研制, 规格 100 mg, 批号 14050015); 磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠、1-癸烷磺酸钠、氯化钠、枸橼酸、磷酸、盐酸均为分析纯。甲醇(色谱纯), 水(超纯水)。

2 方法与结果

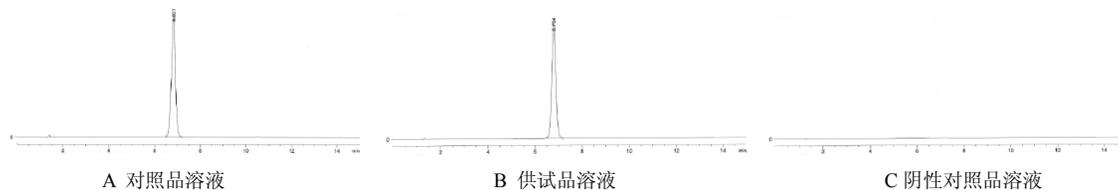


图1 瑞巴派特 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of rebamipide

2.1.2 溶出条件 ZRS-8L 型智能溶出仪, 浆法, 转速 50 r/min, 溶出体积 900 mL, 溶出温度 (37 ± 0.5) °C; 溶出介质为 pH6.8 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol/L 磷酸二氢钾试液 250 mL 与 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 118 mL, 加水至 1 000 mL), 取样时间 45 min。

2.1.3 空白辅料溶液的制备 取不含瑞巴派特的空白辅料约 18 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 加溶出介质适量, 超声 30 min, 放冷、定容、摇匀、过滤, 即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 取瑞巴派特对照品约 22 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 *N,N*-二甲基甲酰胺超声使溶解, 定容, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取上述储备液 1 mL 置 20 mL 量瓶中, 溶出介质定容至刻度, 摇匀作为对照品溶液。

2.1.5 供试品溶液的制备 取本品细粉适量 (约相当于瑞巴派特 22 mg), 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 加溶出介质适量 (溶出介质包括: pH1.2 盐酸 (含氯化钠)、水、pH6.0 枸橼酸-磷酸二氢钠缓冲液、pH6.8 磷酸缓冲液), 超声 30 min, 放冷、定容、摇匀、过滤, 取续滤液作为供试品溶液。精密移取供试品溶液、对照品溶液各 10 μL 注射进入液相色谱仪。测定瑞巴派特的峰面积, 以外标法计算每个时间点瑞巴派特的溶出量。

2.2 专属性考察

按瑞巴派特片的处方称取各辅料, 分别加入溶出介质水、pH1.2 盐酸 (含氯化钠)、pH6.0 枸橼酸-

2.1 方法

2.1.1 色谱条件 资生堂 C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-1-癸烷磺酸钠溶液 (取 1-癸烷磺酸钠 2.44 g, 加水 1 000 mL, 即得)-磷酸 (100:100:1); 体积流量 1.2 mL/min; 检测波长 326 nm; 进样量 10 μL; 柱温 40 °C。在此条件下, 供试品中瑞巴派特峰能达到基线分离, 理论塔板数为 7 100, 色谱图见图 1。

磷酸二氢钠缓冲液、pH6.8 磷酸缓冲液, 超声 30 min, 放冷、定容、摇匀、过滤, 即得, 精密移取续滤液 10 μL 注入液相色谱仪。结果显示, 空白辅料在瑞巴派特保留时间处并未出峰, 表明辅料不干扰瑞巴派特的测定, 本方法专属性强。

2.3 线性范围考察

精密量取瑞巴派特对照品约 22 mg, 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 加入少量 *N,N*-二甲基甲酰胺超声使溶解, 定容, 摇匀, 作为对照品储备液。将上述对照品储备液用 pH6.8 磷酸盐缓冲液进行一系列稀释, 得到质量浓度分别为 5.533、22.133、55.334、110.667、166.001、221.334 μg/mL 的样品, 分别精密量取上述溶液各 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积均值对样品浓度对进行线性回归, 得回归方程为: $y = 7.7261x - 3.0396$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 瑞巴派特在 5.533 ~ 221.334 μg/mL 线性关系良好。

2.4 滤膜吸附考察

分别取瑞巴派特在 4 个介质中的对照品溶液, 瑞巴派特片在 4 个介质中的溶出液, 取尼龙 6 (孔径 0.45 μm) 和聚醚砜 (PES) (孔径 0.45 μm) 作为过滤头, 分别对瑞巴派特对照品溶液、瑞巴派特片的溶出液作高速离心 (4 000 r/min, 5 min), 分别弃去 0、2、5、8 mL 后取续滤液, 精密移取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录图谱, 与离心后供试品 (对比溶液) 峰面积进行比较。

结果显示在 pH6.0 介质和 pH6.8 介质中, 两种滤膜均略有吸附现象, 当过滤弃去 5 mL 后, 峰面积与高速离心相比偏差均 <2%, 表明与高速离心相比, 两种过滤头对瑞巴派特对照品溶液, 瑞巴派特片溶出液过滤弃去 5 mL 后, 对主药没形成吸附影响, 最终选择此 2 种介质的样品进行过滤处理, 弃去初滤液 5 mL; pH1.2 介质和水介质中, 两种滤膜吸附现象严重, 样品进行高速离心处理后, 无吸附现象, 最终选择在此 2 种介质中样品进行离心处理。

2.5 重复性考察

供试品溶液: 取本品 6 片, 分别精密称取每片质量, 按照 2.1.2 项下溶出条件分别于 45 min 取液 10 mL, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

对照品溶液: 同 2.1.4 项下。

按上述方法平行操作制备 2 份对照品溶液和 6 份供试品溶液, 精密量取上述溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 考察方法的重复性。结果显示本方法重复性良好, 6 份样品瑞巴派特的平均溶出度为 104.4%, RSD 为 0.87%。

2.6 中间精密度考察

照重复性试验方法, 不同日期, 不同实验人员, 不同仪器上重复试验。并计算两个实验人员测定结果的偏差。结果显示本方法中间精密度良好, 12 份样品瑞巴派特的平均溶出度为 102.7%, RSD 为 1.91%。

2.7 加样回收率实验

对照品溶液: 同 2.1.4 项下。

50%供试品溶液: 取空白辅料约 18 mg、瑞巴派特片原料约 11 mg, 分别精密称定, 置同一 200 mL 量瓶中, 加 pH6.8 磷酸盐缓冲液适量, 超声 30 min, 放冷, 定容、摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。平行配制 3 份。

80%供试品溶液: 取空白辅料约 18 mg、瑞巴派特片原料约 18 mg, 分别精密称定, 置同一 200 mL 量瓶中, 加 pH6.8 磷酸盐缓冲液适量, 超声 30 min, 放冷, 定容、摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。平行配制 3 份。

100%供试品溶液: 取空白辅料约 18 mg、瑞巴派特片原料约 22 mg, 分别精密称定, 置同一 200 mL 量瓶中, 加 pH6.8 磷酸盐缓冲液适量, 超声 30 min, 放冷, 定容、摇匀, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。平行配制 3 份。

精密量取上述溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱

仪, 记录色谱图, 按外标法计算供试品溶液中瑞巴派特的含量, 计算回收率。结果显示本方法准确度良好, 9 份样品瑞巴派特的平均回收率为 98.5%, RSD 值为 0.9%。

2.8 供试品溶液稳定性考察

供试品溶液(不同溶出介质): 取本品细粉适量(约相当于瑞巴派特 22 mg), 精密称定, 置 200 mL 量瓶中, 加溶出介质适量(溶出介质分别为: 水、pH 1.2 盐酸(含氯化钠)、pH6.0 枸橼酸-磷酸二氢钠缓冲液、pH6.8 磷酸缓冲液), 超声 30 min, 放冷、定容、摇匀、过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

将供试品溶液在室温条件下放置, 分别于 0、4、26.5、31、36、41 h 时间点进行测定, 计算各时间点含量与 0 时间含量的相对标准偏差, 考察本品在不同溶出介质不同时间点的稳定性。

结果显示供试品溶液(水、pH6.0 介质、pH6.8 介质)在室温条件下放置 41 h 稳定; 供试品溶液(pH 1.2 介质)在室温条件下放置不稳定, 故样品应及时进样。

2.9 耐用性考察

耐用性实验目的在于方法参数发生小的变化时, 测定结果不受影响的程度。方法参数变化见表 1, 每次只改变其中一个参数, 其他参数同方法中一致, 分别以上述条件为参数进样对照品溶液和供试品溶液, 测定结果与方法中指定参数结果进行比较, 计算偏差。结果显示微调色谱系统中柱温、流速、检测波长、磷酸浓度、流动相比和色谱柱, 供试品中瑞巴派特的溶出度无明显差异, 溶出度的 RSD 均小于 2.0%, 本方法耐用性良好。

2.10 测定结果

参照《中国药典》2015 年版第四部溶出度测定方法^[5], 按 2.1.2 溶出条件进行溶出曲线的测定。分别取供试品溶液和对照品溶液, 在 326 nm 的波长处测定吸收度, 计算每片的溶出量。另取部分溶出液, 照 2.1.1 中的色谱条件进样, 以瑞巴派特峰的峰面积外标法计算每片的溶出量。表 2 是分别采用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定的自制片剂溶出曲线数据。

结果显示 HPLC 法测得的结果与紫外分光光度法相当, 而 10 min 后的测定结果离散更小, 显示了更高的精密度。

图 2 是采用高效液相色谱法测定的原研片剂和自制片剂在 pH6.8 磷酸缓冲液中的溶出曲线。结果

表1 耐用性测定结果

Table 1 Results of durability determination

条件	变动因素	质量分数/%	平均质量分数/%	RSD/%
检测波长 (nm)	321	100.4		
	326	100.5	100.4	0.06
	331	100.4		
柱温 (°C)	35	100.4		
	40	100.5	100.4	0.10
	45	100.3		
体积流量 (mL/min)	1.0	100.4		
	1.2	100.5	100.4	0.06
	1.4	100.4		
流动相比	95:105:1	100.7		
	100:100:1	100.5	100.6	0.11
	105:95:1	100.7		
磷酸浓度	100:100:0.8	100.3		
	100:100:1.0	100.5	100.5	0.15
	100:100:1.2	100.6		
色谱柱	Agilent	100.5		
	资生堂	100.5	100.5	0.00
	YMC	100.5		

表2 HPLC法和UV法测定同批次样品的结果对比

Table 2 Comparison of HPLC and UV methods for determination of the same batch samples

取样时间/min	HPLC		UV	
	溶出度/%	RSD/%	溶出度/%	RSD/%
5	17.1	5.5	17.6	7.2
10	58.3	2.1	58.7	3.5
15	85.5	1.8	85.2	2.6
30	100.2	1.5	100.8	2.3
45	103.8	1.2	104.2	2.1

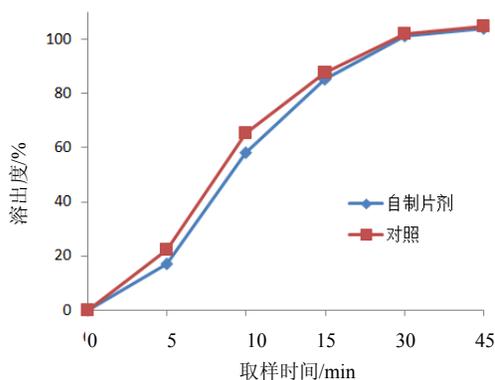


图2 原研片剂(对照)和自制片剂的溶出曲线

Fig. 2 Dissolution curves of original tablets (control) and self made tablets

显示自制的瑞巴派特片和原研片在 pH6.8 缓冲液中, 具有相同的体外释放特征, 经比较具有相似的体外溶出曲线^[6]。

3 讨论

测定固体制剂的多条溶出曲线在仿制药生物等效性试验的预评价等方面发挥重要作用^[7-8], 如何高效、准确、快捷地测定大批量溶出度样品给分析人员造成一定困扰。HPLC 法因绝大部分辅料皆属惰性, 一般不会干扰主成分测定, 且由于 HPLC 法线性范围较宽, 样品均可无需稀释直接进样测定, 省略因 UV 法测定吸光度需要稀释样品的繁琐步骤, 大大提高工作效率^[4]。

在溶出装置的选择上, 参考瑞巴派特片质量标准中溶出度的测定方法, 选用浆法, 转速 50 r/min。在此条件下, 能较好地反映出慢速胃蠕动下的制剂溶出行为^[9]; 在溶出介质选择上, 参考日本橙皮书, 选用水、pH1.2 盐酸(含氯化钠)、pH6.0 枸橼酸-磷酸二氢钠缓冲液、pH6.8 磷酸缓冲液, 介质体积采用 900 mL。

新建立的 HPLC 法测定瑞巴派特片溶出度的分析方法通过了方法学验证, 可用于瑞巴派特片溶出曲线的测定和评价, 相比于现行质量标准中的紫外分光光度法, 具有更高的专属性和准确性, 提高了瑞巴派特片体外溶出度的质量标准, 同时也提高了检测效率, 为瑞巴派特片仿制制剂的一致性评价提供有力支撑。

参考文献

- [1] 李兆申, 杜奕. 瑞巴派特(膜固思达)治疗慢性糜烂性胃炎临床研究报告 [J]. 中国医学论坛报, 2006, 10(33): 31-33.
- [2] 国务院办公厅. 国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见(国办发[2016]8号) [EB/OL]. [2016-03-05]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2016-03/05/content_5049364.htm.
- [3] 新药转正标准第 64 册 [S]. 2009.
- [4] 谢沐风. 高效 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(7): 548-549.
- [5] 中国药典 [S]. 2015.
- [6] 谢沐风. 溶出曲线相似性的评价方法 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(4): 308-311.
- [7] 谢沐风, 张启明. 国外药政部门采用溶出曲线评价口服固体制剂内在品质的情况简介 [J]. 中国药事, 2008, 3(22): 257-261.
- [8] 张启明, 谢沐风. 采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量 [J]. 中国医药工业杂志, 2009, 12(40): 946-950.
- [9] Costa P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing [J]. J Int J Pharm, 2001, 220(1-2): 77.