

HPLC 法测定复方青蒿安乃近片体外溶出度

李 璐¹, 李丹凤²

(1. 广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西南宁 530001; 2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 广西南宁 530021)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定复方青蒿安乃近片体外溶出度。**方法** 分析采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (25:75); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 250 nm; 柱温 30 ℃。测定采用桨法; 溶出介质为 0.1 mol/L 盐酸溶液 (900 mL); 转速 75 r/min; 取样时间 60 min。**结果** 该药物中安乃近与葛根素分别在 10.77~64.61、1.04~6.27 μg/mL 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.9%、100.6%。相同厂家样品中两者的溶出行为相似, 而在不同厂家间有显著差异。**结论** 该方法简便、准确、可行, 可用于复方青蒿安乃近片的质量控制。

关键词: 复方青蒿安乃近片; 溶出度; 安乃近; 葛根素; HPLC

中图分类号: R927.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)07-1485-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.07.010

Determination of *in vitro* dissolution rate of Compound Qinghao Analgin Tablets by HPLC

LI Lu¹, LI Dan-feng²

(1. Guangxi-ASEAN Test Center for Food and Drug Safety, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Zhuang Nationality Autonomous Regional Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for determining the *in vitro* dissolution rate of Compound Qinghao Analgin Tablets. **METHODS** The analysis was performed on Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (25:75), flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was set at 250 nm, and column temperature was maintained at 30 ℃. Paddle method was adopted in the determination, dissolution medium was 0.1 mol/L HCl solution (900 mL), rotating speed was 75 r/min, and sampling time was 60 min. **RESULTS** Analgin and puerarin in this drug displayed good linear relationships within the ranges of 10.77-64.61 μg/mL and 1.04-6.27 μg/mL, whose average recoveries were 99.9% and 100.6%, respectively. The similar dissolution behaviors of these two constituents were observed in the samples from the same manufacturers, while obvious differences due to different manufacturers were also found. **CONCLUSION** This simple and accurate method is feasible for the quality control of Compound Qinghao Analgin Tablets.

KEY WORDS: Compound Qinghao Analgin Tablets; dissolution rate; analgin; puerarin; HPLC

复方青蒿安乃近片是一种常用的中西药复方制剂感冒药, 处方中含青蒿、葛根、安乃近和马来酸氯苯那敏等主要成分, 多用于外感风热感冒。现行的质量标准^[1] 仅以崩解时限作为其溶解释放的控制指标。但是, 中药制剂生产多为传统工艺, 质量控制过程不够完善, 一些有效成分含有量高, 但溶

出少, 未能发挥应有的疗效, 因此还需建立科学合理的溶出度质量标准来衡量其内在品质^[2]。溶出度是模拟口服固体制剂在胃肠道崩解和溶出的体外试验方法^[3], 不仅能反应中成药的质量情况, 还能反应体内的吸收和药效情况。本实验参考文献 [4-9], 利用 HPLC 法同时测定复方青蒿安乃近片

收稿日期: 2015-10-16

作者简介: 李 璐 (1981—), 女 (壮族), 主管药师, 从事药物分析工作。Tel: 15878805820, E-mail: 476062357@qq.com

中安乃近和葛根素含有量来评价其体外溶出度，为控制该药品内在质量，以及评价其体内生物利用度提供了更好的依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters2695-2998 HPLC 色谱仪，包括二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站（美国 Waters 公司）；RC806 溶出仪、ZKT-18 真空脱气仪（天大天发科技有限公司）；KS-9983-2 双频台式超声波清洗机（45 kHz、500 W，郑州万博仪器设备有限公司）；XD205DU 电子天平、Mettler-DT320 酸度计（瑞士梅特勒-托利多公司）。

1.2 试药 复方青蒿安乃近片购自 3 个厂家（A、B、C）。安乃近（批号 100002-201206，按 $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$ 计，HPLC 法测得含有量为 94.5%，UV 法测得含有量为 94.6%）、葛根素对照品（中国食品药品检定研究院，批号 110752-200912，含有量 96.0%）；水为去离子水；甲醇为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 系统适用性及干扰试验 采用 Waters Symmetry C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ）；以甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾（用磷酸调 pH 至 3.5）（25：75）为流动相；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 250 nm；柱温 30 $^{\circ}C$ ；进样量 20 μL 。理论塔板数按葛根素峰计算，不低于 3 000，各组分峰与相邻峰之间的分离度均大于 1.5。

按处方量制备不含安乃近和葛根素的阴性样品，称取 0.4 g（约 1.1 片量），置于 1 000 mL 量瓶中，0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，滤膜过滤，取续滤液，作为阴性样品溶液。精密吸取 20 μL ，注入液相色谱仪，发现在两主峰保留时间处均无干扰吸收峰，具体见图 1。

2.2 溶出介质的配制 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、0.1 mol/L 盐酸溶液均参照《中国药典》2010 年版二部附录 XVD 配制。

2.3 溶液的配制

2.3.1 供试品溶液 取本品 1 片，按照溶出度测定法（《中国药典》2010 版二部^[10]附录 XC 第二法），加入 900 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液作为溶出介质，转速为 75 r/min，依法操作，60 min 后取样 10 mL，0.8 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3.2 对照品溶液 分别精密称取安乃近 110 mg 与葛根素 10 mg，置于同一 200 mL 量瓶中，溶出介质溶解并稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品贮

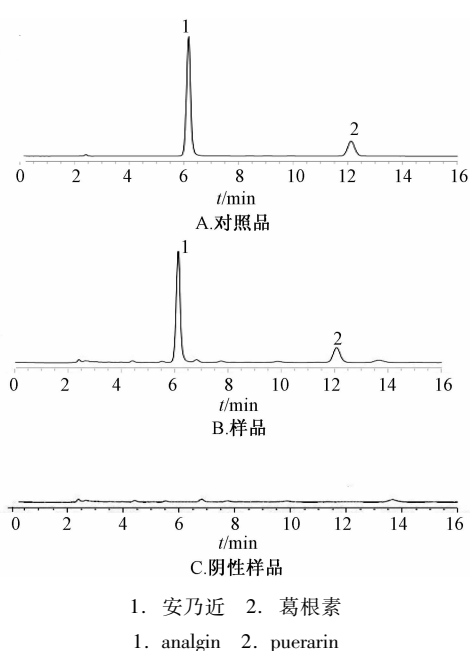


图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

备液。再精密量取 10 mL，置于 100 mL 量瓶中，溶出介质稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4 精密度实验 精密量取安乃近和葛根素混合对照溶液 20 μL ，连续进样 6 次，测得两者 RSD 分别为 0.08% 和 0.11%，表明仪器精密度良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品贮备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度，摇匀，即得。精密量取 20 μL ，以质量浓度（C， $\mu g/mL$ ）为横坐标，峰面积为纵坐标（A）进行线性回归，结果见表 1。

表 1 两种成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of two constituents

成分	回归方程	r	线性范围/（ $\mu g \cdot mL^{-1}$ ）
安乃近	$A = 27\,845C - 727.23$	0.999 9	10.77~64.61
葛根素	$A = 85\,861C + 336.63$	0.999 9	1.04~6.27

2.6 加样回收率试验 称取样品 0.4 g（约 1.1 片量），分别置于 6 个 100 mL 量瓶中，加入混合对照品贮备液 8、10、12 mL 各 2 份，溶出介质超声溶解并稀释至刻度，摇匀，过滤，精密量取续滤液 2 mL，置于 20 mL 量瓶中，溶出介质稀释至刻度，摇匀。精密吸取 20 μL ，注入液相色谱仪，记录峰面积，计算回收率。结果见表 2 和表 3。

2.7 滤膜吸附情况考察 取复方青蒿安乃近片 1 片，按“2.3.1”项下方法处理，60 min 后取样，离心分离（3 000 r/min）10 min 后取上清液，滤

膜过滤，取续滤液（弃去 1 mL 初滤液）。各吸取 20 μ L，注入液相色谱仪，记录峰面积，测得安乃近及葛根素的滤膜吸附率分别为 0.08% 和 0.09%，即均在 2% 以下^[11]，表明所用滤膜基本无吸附干扰影响。

表 2 安乃近加样回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery tests for analgin					
原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
5.717 3	4.307 3	9.983 6	99.05		
6.254 5	4.307 3	10.549 1	99.71		
5.886 4	5.384 1	11.301 8	100.58	99.86	0.85
6.301 4	5.384 1	11.619 5	98.77		
5.980 2	6.461 0	12.502 3	100.95		
5.905 9	6.461 0	12.374 5	100.12		

表 3 葛根素加样回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery tests for puerarin					
原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
0.354 4	0.337 9	0.691 3	99.72		
0.372 2	0.337 9	0.716 0	101.59		
0.354 3	0.422 4	0.785 4	102.06	100.64	1.02
0.390 6	0.422 4	0.812 7	99.93		
0.370 7	0.506 9	0.880 8	100.86		
0.366 1	0.506 9	0.871 2	99.65		

2.8 稳定性考察 将供试品溶液与安乃近、葛根素混合对照品溶液放置于室温下，分别于 0、2、4、6、8、12 h 依法测定，测得峰面积 RSD 均小于 1.0%，表明供试品及对照品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 溶出行为考察

2.9.1 转法的选择 溶出度的测定方法有转篮法、桨法及小杯法，胶囊剂适用转篮法，而片剂适用桨法^[12]。由于本品处方中含有大量中药成分，在溶出度测定过程中易堵塞转篮筛网，影响测定结果，故选择桨法。

2.9.2 转速与取样时间的选择 按照溶出度测定法，以 0.1 mol/L 盐酸溶液 900 mL 为溶出介质，设定转速为 100、75、50 r/min，分别于 5、10、15、30、45、60、90 min 时取样，过滤，及时补充相同体积和温度的溶出介质，精密吸取 20 μ L 依法测定。结果表明，取样时间为 60 min 时，3 种转速的累积溶出量均达到 85% 以上^[12]，本实验选择转速为 75 r/min，此时无片粉堆积现象，比 100 r/min 更接近人体的胃肠蠕动情况。因此，最终选择转速

为 75 r/min，溶出时间为 60 min。

2.9.3 不同溶出介质的溶出曲线 分别以 0.1 mol/L 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水各 900 mL 为溶出介质，依法进行溶出度测定，溶出曲线见图 2。由图可知，两种成分在 0.1 mol/L 盐酸溶液中溶解性和溶出行为的区分能力较好，故选择其作为溶出介质。

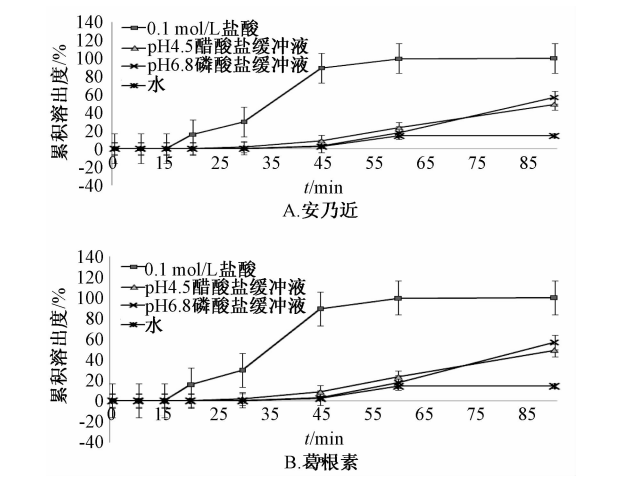


图 2 两种成分在不同溶出介质中的溶出曲线
Fig. 2 Dissolution curves of two constituents in different dissolution mediums

2.9.4 不同厂家的溶出曲线 分别取 3 个厂家各 3 个批次的复方青蒿安乃近片样品 6 片，依法测定，分别于 5、10、15、30、45、60 min 时取样，过滤，及时补充相同体积和温度的溶出介质。精密吸取 20 μ L，依法测定，计算其各取样时间点的累积溶出量，绘制溶出曲线，见图 3。

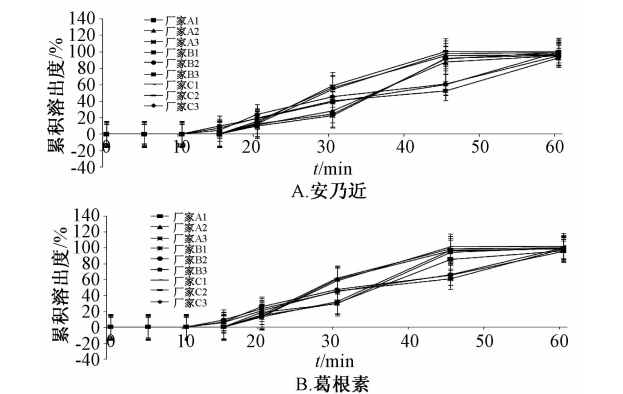


图 3 不同厂家两种成分的溶出曲线
Fig. 3 Dissolution curves of two constituents from different manufacturers

2.9.5 溶出曲线相似因子 (f_2) 分析溶出行为差异 计算公式如下。

$$f_2 = \lg \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2}{n}}}$$

如果 $50 \leq f_2 \leq 100$ ，则表示溶出曲线差异无统计学意义；如果 $f_2 < 50$ ，则认为差异有统计学

意义^[13]。

用溶出曲线相似因子拟合分析 3 个厂家 9 批样品安乃近和葛根素的溶出差异，结果见表 4 和表 5。由表可知，相同厂家相似因子均大于 50，表明其溶出行为为无明显统计学差异，而不同厂家存在显著差异。

表 4 安乃近相似因子
Tab. 4 Similarity factors for analgin

厂家及批次	厂家 A1	厂家 A2	厂家 A3	厂家 B1	厂家 B2	厂家 B3	厂家 C1	厂家 C2	厂家 C3
厂家 A1	100.0	76.6	84.1	38.9	41.0	42.7	46.8	43.3	45.3
厂家 A2	78.5	100.0	74.6	35.1	39.1	37.9	47.0	43.1	45.9
厂家 A3	89.1	74.6	100.0	37.9	42.5	40.7	43.8	40.5	42.4
厂家 B1	38.4	41.8	38.9	100.0	68.2	68.7	36.7	35.2	38.7
厂家 B2	41.0	44.0	40.1	68.2	100.0	68.8	40.8	39.2	42.5
厂家 B3	42.7	45.6	41.7	68.7	68.8	100.0	39.9	37.9	40.7
厂家 C1	46.8	48.4	45.3	36.7	40.8	39.8	100.0	80.5	78.9
厂家 C2	41.7	43.2	40.5	35.2	39.1	37.9	80.5	100.0	78.6
厂家 C3	43.8	45.9	42.4	37.8	42.5	40.7	82.8	78.6	100.0

表 5 葛根素相似因子
Tab. 5 Similarity factors for puerarin

厂家及批次	厂家 A1	厂家 A2	厂家 A3	厂家 B1	厂家 B2	厂家 B3	厂家 C1	厂家 C2	厂家 C3
厂家 A1	100.0	69.2	66.5	46.9	47.7	47.7	43.9	46.8	44.3
厂家 A2	69.2	100.0	76.5	42.1	43.5	44.8	45.3	48.4	44.7
厂家 A3	66.5	76.5	100.0	41.2	42.3	43.5	47.9	46.0	46.9
厂家 B1	46.9	41.8	42.8	100.0	67.5	74.8	38.8	41.2	44.4
厂家 B2	47.7	43.5	42.3	75.5	100.0	79.1	40.5	42.0	43.0
厂家 B3	49.1	44.8	43.5	76.0	79.1	100.0	40.8	42.0	43.0
厂家 C1	45.2	47.3	48.8	38.8	42.9	40.4	100.0	76.8	65.0
厂家 C2	43.2	44.0	46.0	40.0	42.0	42.0	83.0	100.0	90.3
厂家 C3	44.2	44.7	46.9	41.1	43.0	42.9	80.4	90.3	100.0

3 讨论和结论

复方青蒿安乃近片中的安乃近是一种有效的解热镇痛药，它在胃中酸性条件下几乎全部转变成活性代谢产物 4-甲氨基安替比林，易溶于水。葛根在《中国药典》2010 年版一部^[14]中收录其功效为解肌退热，生津止渴；升阳止泻，通经活络，解酒毒，可用于外感发热头痛。其中，葛根素是其主要有效成分，由于结构中具有多苯环和多羟基，故极性较大，水溶性较小，仅为 0.011 mol/L，脂溶性也小，难以被胃肠道等生物膜吸收，导致生物利用度低，吸收较差，口服生物利用度小于 15%^[15]。该药物是中西药复方制剂，通过中药和西药共同协调来发挥作用，但是各成分理化性质差异较大，故本实验选择有效成分中溶解性最大和最小的以上两

种成分来控制其溶出度。

在 200 ~ 400 nm 波长范围内，对安乃近和葛根素对照品溶液分别进行紫外光谱扫描，发现两者最大吸收波长分别为 260 nm 和 250 nm。由于样品中葛根素的含有量较低，为提高其检测灵敏度，故选择最大吸收波长为 250 nm，以避免该成分峰面积过小，同时也能使安乃近得到准确测定。

3 个厂家样品安乃近和葛根素溶出量在 15、30、45、60 min 内的累积溶出量见表 6 和表 7，可见两种成分的累积溶出量在 45 min 前均有显著差异。其中，厂家 B 在 45 min 时的累积溶出量均不到 70%，3 个厂家在 60、90 min 时均大于 85%，但 90 min 取样时间过长。综合考虑上述因素，选择 60 min 作为溶出度取样考察点较为合理。

表 6 安乃近累积溶出量 (%)
Tab. 6 Accumulative dissolutions of analgin (%)

厂家	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
A	0	24. 9	90. 5	96. 9	97. 5
B	6. 9	41. 8	57. 8	95. 9	96. 0
C	0	56. 5	97. 7	98. 8	99. 2

表 7 葛根素累积溶出量 (%)
Tab. 7 Accumulative dissolutions of puerarin (%)

厂家	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min
A	0	30. 7	92. 2	98. 2	101. 1
B	7. 1	45. 9	64. 1	98. 4	98. 4
C	0	60. 0	98. 8	100. 3	100. 8

3 个厂家生产的复方青蒿安乃近片均为糖衣片，其崩解时间在 25 ~ 35 min 内，均符合规定。从“2. 9. 5”项结果可知，各厂家溶出曲线存在显著差异，可能与原料粉碎粒度、辅料品种、用量及包衣工艺有密切关系。因此，仅以崩解时限为溶解释放的控制指标并不全面。

本实验目的在于对该药物建立一个溶出度的测定方法，能客观反映安乃近和葛根素的具体溶出情况。两者在单一检测波长（250 nm）下均实现良好的分离度、准确度和精密度，该方法简单，可操作性强，在 12 h 内稳定性良好，可用于复方青蒿安乃近片的质量控制。

参考文献：

[1] 国家药品标准（化学药品上升国家标准）：第 14 册[S]. WS-10001-（HD-1360）-2003.
[2] 罗云，郝伟伟，张婧，等. 基于多指标成分同时检测

的六味地黄浓缩丸溶出度测定[J]. 中国中药杂志，2014，39(2)：240-245.
[3] 胡昌勤，潘瑞雪. 溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效性的研究进展[J]. 中国新药杂志，2014，23(1)：44-51.
[4] 刘珊珊，黄薇. 高效液相色谱法测定复方青蒿安乃近片中安乃近的含量[J]. 广西医学，2006，28(11)：1773-1775.
[5] 郭怀忠，庞晓敏，王进文，等. 高效液相色谱法测定维 C 银翘片溶出度的研究[J]. 中成药，2011，33(7)：1178-1182.
[6] 吕兴萍，胡容峰，叶蕾，等. 高效液相色谱法测定六味地黄丸的溶出度[J]. 中成药，2014，36(3)：652-654.
[7] 董红环，程显隆，刘洋，等. 雷奈酸锶干混悬剂溶出度方法的建立[J]. 药物分析杂志，2015，35(3)：543-547.
[8] 殷果，李慧义，闫研，等. HPLC 法测定青蒿素哌喹片中青蒿素的溶出度[J]. 药物分析杂志，2014，34(2)：368-371.
[9] 张艳菊，吴清，倪健，等. 不同厂家三黄片中大黄素、大黄酚的溶出度[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(9)：104-108.
[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版二部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：附录 85-附录 87.
[11] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：272-275.
[12] 谢沐风. 如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J]. 中国医药工业杂志，2012，43(3)：A23-A32.
[13] 刘翔，赵炽彬. 国产安乃近片的溶出度研究[J]. 实用预防医学，2011，18(7)：1339-1341.
[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2010 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2010：312-313.
[15] 闫雪生，程立方. 葛根素新型制剂的研究概况[J]. 中国医院药学杂志，2011，31(15)：1294-1297.