

的细菌内毒素检查均符合起草的质量标准要求。

表 6 丁酸氯维地平细菌内毒素检查结果

Tab 6 Results of bacterial endotoxin test for clevipidine butyrate

鲎试剂	样品	NPC	PPC	PC	NC
1211081	121110	--	++	++	--
	121122	--	++	++	--
	121205	--	++	++	--
12070312	121110	--	++	++	--
	121122	--	++	++	--
	121205	--	++	++	--

注: + -形成凝胶且倒转凝胶不变形或滑落; --未形成凝胶或形成凝胶但倒转变形

Note: + -gel forms and does not deform or slide when inversion; -- not to form gel or gel forms but deforms when inversion

3 讨论

丁酸氯维地平不溶于水, 因此寻找合适的溶媒是本试验的最关键环节。根据溶解性考察结果并结合文献, 选用60%乙醇溶液作为溶媒溶解样品, 并通过细菌内毒素检查用水进一步稀释后得到均一透明的供试品溶液。不同厂家的鲎试剂在工艺、质量等方面有一定差异, 其抗干扰能力也存在差异, 通过采用2个不同厂家的鲎试剂进行试验, 可客观地评价样品浓度或溶媒浓度对鲎试剂与内毒素发生凝集反应的干扰程度。试验结果证实, 60%乙醇溶液及超声2 min对细菌内毒素的活性无明显影响, 同时4%乙醇溶液对细菌内毒素与湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化工业有限公司2个厂家鲎试剂的凝集反应均无干扰作用。

根据中国药典2010年版二部附录XIE“细菌内毒素检查法”和附录XIX M“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”以及丁酸氯维地平的临

床实际应用情况, 确定该品种细菌内毒素检查限值为 $4.7 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。目前市售鲎试剂 λ 通常在 $0.5 \sim 0.03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 根据公式 $MVD = C \times L / \lambda$, 则本实验中丁酸氯维地平对应的最大有效稀释倍数分别为94, 188, 376, 752, 1 504倍。干扰试验结果表明, 在本实验条件下, 丁酸氯维地平对细菌内毒素检测的最大不干扰浓度为 $0.013 \text{ 3 mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (稀释倍数为750倍), 故可选择灵敏度 $0.06 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上的鲎试剂对本品进行细菌内毒素检查。根据试验结果和临床实际应用情况, 确定丁酸氯维地平细菌内毒素检查方法如下: 取本品适量, 按每1 mg本品加入60%乙醇溶液5.0 mL的比例溶解后, 用细菌内毒素检查用水稀释15倍, 依法检查(中国药典2010年版二部附录XIE), 每1 mg丁酸氯维地平中含内毒素的量应 $<4.7 \text{ EU}$ 。本试验起草的质量标准可用于丁酸氯维地平原料的细菌内毒素检查, 控制其质量。

REFERENCES

- [1] LI L, BI K S, HU X. Pharmacology and clinical studies of clevipidine butyrate injectable emulsion [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2010, 19(12): 1003-1006.
- [2] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 99-101, Appendix 212-213.
- [3] ZHANG Z Y, ZHANG X P, MA Y P, et al. Determination of bacterial endotoxins in paclitaxel liposome [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2001, 32(6): 266-267.
- [4] CHENG C L, GAO T Q. Bacterial endotoxin test for clofarabine injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, (8): 675-677.
- [5] ZHANG D B. Study on testing for bacterial endotoxin in ibuprofen [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(3): 261-264.

收稿日期: 2013-03-14

HPLC 同时测定依折麦布辛伐他汀片中两种成分的含量

于鑫, 周增慧, 袁慧雅, 曲衍衍, 毕开顺, 陈晓辉* (沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定依折麦布辛伐他汀片中依折麦布和辛伐他汀的含量。方法 色谱柱 Phenomenex Luna Phenyl Hexyl(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(pH 4.5)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 231 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。结果 依折麦布在 10.0~100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 辛伐他汀在 20.0~200.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.999\ 9$)。依折麦布的平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.3%($n=9$), 辛伐他汀的平均回收率为 99.8%, RSD 为 0.9%($n=9$)。结论 本方法简便、可靠、准确度高、重复性好, 可用于同时测定依折麦

作者简介: 于鑫, 女, 硕士生 Tel: 15942040603 E-mail: yuxinlisa@126.com *通信作者: 陈晓辉, 女, 博士, 博导, 教授 Tel: (024)23986259 E-mail: exh_syphu@hotmail.com

布辛伐他汀片中的依折麦布和辛伐他汀的含量。

关键词：依折麦布；辛伐他汀；高效液相色谱法；含量测定

中图分类号：R917.101

文献标志码：B

文章编号：1007-7693(2013)09-1008-04

Simultaneous Determination of Two Constituents in Ezetimibe and Simvastatin Tablets by HPLC

YU Xin, ZHOU Zenghui, YUAN Huiya, QU Kankan, BI Kaishun, CHEN Xiaohui* (Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in ezetimibe and simvastatin tablets. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Luna Phenyl Hexyl column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (pH 4.5) as mobile phase, gradient elution, at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detective wavelength was 231 nm and the temperature of column was 30 °C. **RESULTS** The calibration curves of ezetimibe and simvastatin were linear in the range of 10.0–100.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$), 20.0–200.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries of ezetimibe and simvastatin were 99.5%, RSD=1.3% ($n=9$) and 99.8%, RSD=0.9% ($n=9$), respectively. **CONCLUSION** The method is simple, reliable and accurate for simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in ezetimibe and simvastatin tablets.

KEY WORDS: ezetimibe; simvastatin; HPLC; determination

依折麦布辛伐他汀片是用于治疗高血脂、高胆固醇症的复方制剂。依折麦布是新型选择性胆固醇吸收抑制剂，能抑制外源性胆固醇的吸收^[1]。辛伐他汀能竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶的活性，减少细胞内游离胆固醇的合成^[2]。依折麦布与辛伐他汀联用可以从胆固醇的内、外源性途径调节血脂，从而达到显著效果^[3]。目前，同时测定 2 种成分含量的方法国内未见报道。本实验建立了 HPLC 同时测定依折麦布辛伐他汀片中的依折麦布和辛伐他汀的含量，方法简便、可靠，能有效控制该复方剂片中 2 种成分的含量。

1 仪器和试剂

Chromaster 5000 高效液相色谱仪(日本日立公司)，Chromaster 5410 紫外检测器，Chromaster 色谱工作站；Acculab 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

依折麦布对照品(天津科洛医药公司，批号：20120823，纯度>99.9%)；辛伐他汀对照品(中国药品生物制品检定所，批号：100601-201003，纯度>99.0%)；依折麦布辛伐他汀片(沈阳津昌制药有限公司，批号：20120826，20120828，20120830，规格：10 mg/20 mg)；乙腈(色谱纯，百灵威科技有限公司)，磷酸二氢钠为分析纯，水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 混合对照品溶液的配制 取依折麦布对照品约 10 mg，辛伐他汀对照品约 20 mg，分别精密

称定，置于 50 mL 量瓶中，加稀释溶液[0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH 值至 4.5)-乙腈(55 : 45)]适量使溶解并稀释至刻度，摇匀，即得依折麦布浓度为 200.0 μg·mL⁻¹，辛伐他汀浓度 400.0 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的配制 取本品 10 片，精密称定，研细，精密称取适量(约相当于依折麦布 5 mg，辛伐他汀 10 mg)，置于 100 mL 量瓶中，加稀释溶液适量，超声溶解，稀释至刻度，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，得供试品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的配制 称取除依折麦布和辛伐他汀以外处方量的其他辅料，按依折麦布辛伐他汀片的制备工艺制成不含依折麦布和辛伐他汀的阴性制剂，同“2.1.2”项下方法制得阴性对照溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性

色谱柱：Phenomenex Luna Phenyl Hexyl (4.6 mm×150 mm, 5 μm)；流动相：0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(pH 4.5)(A)-乙腈(B)；梯度洗脱程序：0~10 min, A 55%，10~15 min, A 55%→45%，25~26 min, A 45%→55%，26~35 min, A 55%；流速：1.0 mL·min⁻¹；检测波长：231 nm；柱温：30 °C；进样量：10 μL。理论板数以依折麦布和辛伐他汀计均>5 000，依折麦布峰及辛伐他汀峰与相邻色谱峰间分离度>2.0，拖尾因子符合要求。

2.3 专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照

溶液,按“2.2”项下色谱条件,进样分析,记录色谱图。依折麦布的保留时间为 10.7 min,辛伐他汀的保留时间为 21.4 min,空白辅料对样品测定无干扰,结果见图 1。

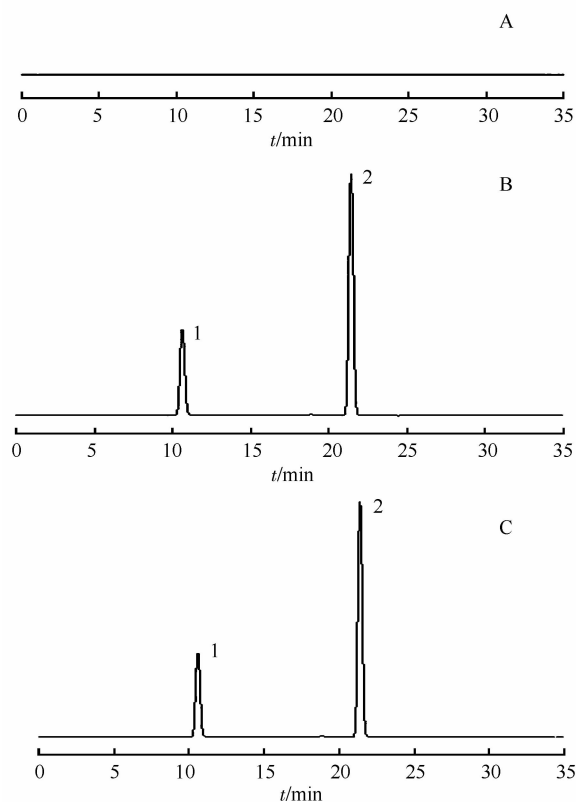


图 1 高效液相色谱图
A-阴性对照溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-依折麦布; 2-辛伐他汀
Fig 1 HPLC chromatograms
A-blank solution; B-standard solution; C-sample solution; 1-ezetimibe; 2-simvastatin

2.4 线性关系的考察

精密量取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用稀释溶液稀释至刻度,得系列对照品溶液。进样分析,记录峰面积,以峰面积 A 为纵坐标,浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标作图,得依折麦布回归方程为 $A=2.332\times 10^4C-2.655\times 10^3(r=0.999\ 8)$; 辛伐他汀回归方程为 $A=3.175\times 10^4C+1.702\times 10^4(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,依折麦布在 $10.0\sim 100.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内,辛伐他汀在 $20.0\sim 200.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5 定量限和检测限

精密量取混合对照品溶液适量,依次稀释,进样分析。当信噪比 $S/N=10$ 时,依折麦布的定量限为 $0.015\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,辛伐他汀的定量限为 $0.01\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当信噪比 $S/N=3$ 时,依折麦布的检

测限为 $0.005\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,辛伐他汀的检测限为 $0.004\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 回收率试验

取处方量空白辅料 9 份,按处方量 80%,100%,120%分别精密加入依折麦布和辛伐他汀对照品,按“2.1.2”项下方法制备低、中、高 3 种浓度的供试品溶液各 3 份,在上述色谱条件下进样分析,计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果($n=9$)
Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

组分	理论值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	平均回收率/%	RSD/ %
依折麦布	40.5	40.3	99.5	99.5	1.3
	39.9	40.0	100.3		
	40.3	39.6	98.3		
	49.8	50.4	101.2		
	50.9	50.1	98.4		
	50.5	50.1	99.2		
	60.4	59.9	99.2		
	60.6	59.6	98.3		
	59.2	60.1	101.5		
	79.1	80.2	101.4		
辛伐他汀	80.0	79.3	99.1	99.8	0.9
	79.4	79.3	99.9		
	100.2	100.9	100.7		
	100.0	99.6	99.6		
	100.5	99.1	98.6		
	120.1	119.6	99.6		
	119.8	119.9	100.1		
	120.4	119.4	99.2		

2.7 精密度试验

按照回收率试验方法制备低、中、高 3 个浓度的供试品溶液,分别取 3 种不同浓度,平行测定 5 次,得到日内精密度,同时每一浓度连续测定 5 d,得日间精密度。依折麦布低、中、高 3 种浓度日内精密度 RSD 分别为 0.9%, 0.9%, 1.0%, 日间精密度 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 1.1%; 辛伐他汀低、中、高 3 种浓度日内精密度 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 1.1%, 日间精密度 RSD 分别为 1.4%, 0.8%, 1.0%。

2.8 重复性试验

取同一批依折麦布辛伐他汀片(批号: 20120826),按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,计算依折麦布和辛伐他汀含量的 RSD 分别为 0.7%, 0.8%。结果表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温下放置,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样分析,记录峰面积,计算依折麦布和辛伐他汀峰面积的 RSD 分别为 0.3%和 0.6%。

表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内稳定。

2.10 样品测定

取 3 批依折麦布辛伐他汀片(批号: 20120826, 20120828, 20120830), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 按外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of sample determination($n=3$)

批次	依折麦布		辛伐他汀	
	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
20120826	99.7	1.45	100.5	0.98
20120828	99.6	1.44	100.1	1.73
20120830	99.6	1.65	100.9	1.15

3 讨论

3.1 流动相系统的选择

参考相关文献^[4-7], 考察了甲醇-水, 乙腈-水, 乙腈-磷酸二氢钠等多个流动相系统, 结果发现, 使用乙腈-水系统时峰拖尾, 而使用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠(pH 4.5)时分离效果较好, 改善峰拖尾现象, 基线平稳。依折麦布与辛伐他汀因结构相差较大, 所以极性也相差较大, 等度洗脱时辛伐他汀保留时间过长, 采用梯度洗脱程序, 依折麦布与辛伐他汀在 25 min 内能很好的分离, 保留时间适中, 峰形变锐。

3.2 检测波长的选择

2 种有效成分在紫外区域的吸收光谱图显示, 依折麦布在 231 nm 处有最大吸收, 辛伐他汀在 231, 238, 247 nm 有吸收峰, 由于在本制剂中依折麦布成分含量相对较低, 所以选择 231 nm 作为检

测波长, 2 种有效成分的响应值高, 重现性好。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

依折麦布和辛伐他汀均几乎不溶于水, 易溶于乙腈, 使用稀释溶液溶解样品, 样品稳定性好, 峰形好。同时考察了提取方法, 结果证明超声提取更加简便, 回收率更高。

本研究建立了 HPLC 同时测定依折麦布辛伐他汀片中 2 种成分含量的方法, 该方法专属性强、准确度高、重复性好, 为进一步完善该制剂的质量标准提供依据。

REFERENCES

- [1] HE P, LI J, JIANG L. Progress in clinical research for ezetimibe [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2012, 33(2): 168-171.
- [2] WANG F, TANG G. Pharmacology and clinical evaluation of a new cholesterol lowering drug vytorin (ezetimibe/simvastatin) [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2011, 20(15): 1364-1367.
- [3] ZHONG Y, LIU T, LIU A, et al. Dyslipidemia and advances in lipid lowering drugs [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2011, 30(2): 216-219.
- [4] ASHISH S D, PANKAJ K K, HEMENDRA S J. Validation of a stability-indicating LC method for assay of ezetimibe in tablets and for determination of content uniformity [J]. Chromatographia, 2008, 67: 137-142.
- [5] ZHENG J, ZHENG G, LI H, et al. Determination of content and the related substances of simvastatin tablets by HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2010, 45(9): 702-705.
- [6] HU C, ZHENG G, ZHENG J. RP-HPLC determination of the related substances of simvastatin capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(9): 856-859.
- [7] LIU M, HE J, WANG X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(8): 1339-1345.

收稿日期: 2012-11-26

抱石莲生物检定的方法学考察

李一卉¹, 段菊屏¹, 康丽群², 何颖³, 陈玉祥^{3*} (1.长沙市中医医院, 长沙 410100; 2.娄底市中心医院, 湖南 娄底 417000; 3.中南大学药学院, 长沙 410013)

摘要: 目的 建立中药抱石莲的生物检定法。方法 采用水提、醇提、水提醇沉等方法提取抱石莲有效成分, 体外抑菌试验检测抱石莲中药提取物的抗菌活性及适用菌株和剂量范围, 探索药物对敏感菌株的量效曲线, 构建适用于一剂量的效应模式。结果 抱石莲药材的水提物具有较好的抑菌活性, 其对金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)的抑菌圈直径达到 17.39 mm; 当抱石莲的浓度为 $0.25\sim 1.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抱石莲的剂量对数和反应效应呈线性关系。结论 抱石莲生物检定法简单、合理、可行, 可作为抱石莲质量控制的方法之一。

作者简介: 李一卉, 女, 硕士, 药师 Tel: (0731)85259118
教授 Tel: (0731)85259118 E-mail: 978746044@qq.com

E-mail: lyh19850124@yaoo.com.cn *通信作者: 陈玉祥, 男, 博士,