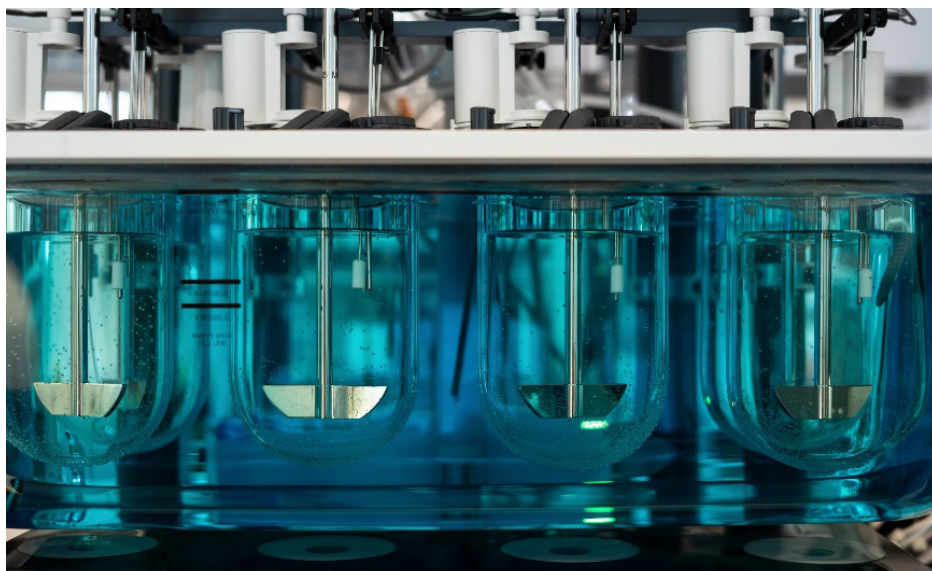


使用安捷伦在线液相系统实现自动化溶出测试

作者

周影, 陈波, 刘艳杰
安捷伦科技(中国)有限公司



摘要

制剂溶出度是衡量药物质量的关键指标。在进行溶出测试的过程中,研究者需在规定时间内对 6 杯平行测试的溶出液分别进行多次取样,在溶出实验结束后再对不同时间点采集的样品进行集中检测分析。整个分析过程繁琐,且容易引入人为误差。本研究将安捷伦在线液相色谱系统与 Flexible Cube 联用,实现了全自动无人化实时溶出测试。Flexible Cube 的自动传输和多管路切换功能可以保障自动化分析的准确度和效率。

前言

根据 2020 年版《中国药典》通则 0931 的定义，“溶出度系指活性药物从片剂、胶囊剂或颗粒剂等普通制剂中在规定条件下溶出的速率和程度”。根据溶出度实验结果，可以预测药物在人体内释放情况以及制剂中药物成分的含量。

在传统的溶出测试模式下，为获得有效的溶出曲线，研究者需要在规定时间内分别从 6 个溶出杯中依次取样进行平行测试，以分析制剂溶出速度和程度。取样的及时准确性对测试结果有直接的影响，因此取样时需详细记录样品来源及取样时间。另外，取样点较多且密集，只能待所有取样全部完成后再统一使用 HPLC 进行含量检测。这种测试模式不仅需要多人配合完成，而且无法在溶出实验中实时监测药物的溶出情况，同时繁琐的取样过程和前处理步骤也有可能引入人为误差。

本研究将安捷伦在线液相色谱与 Flexible Cube 模块联用，建立了用于溶出测试的全流程自动化分析系统。该系统利用安捷伦在线液相色谱监测软件监控并触发 Flexible Cube 在指定时间进行溶出液过滤和样品传输，定时通过流路切换将各时间点的溶出样品转移至在线液相色谱系统进行实时分析，使分析人员能够实时查看溶出度或释放度，并根据实时检测结果及时进行制剂工艺技术调整或质量端的批次放行。

实验部分

试剂和样品

乙腈为 HPLC 级，购于 Merck；所用实验用水为自制的 HPLC 级纯化水；磷酸二氢钠为 HPLC 级，购于 CNW；磷酸为 HPLC 级，购于 DIKMA。样品为：外购丙戊酸钠片（速释片剂、缓释片剂）

仪器和设备

采用 Agilent InfinityLab 在线液相色谱系统，配备如下安捷伦模块：Agilent 1260 Infinity II 全能泵（部件号 G7104C）；Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器组件（部件号 G3167AA）；Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱（部件号 G7116A），配备标准热交换器（部件号 G7116-60051）；Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器（部件号 G7117C），配备最大光强度卡套式流通池（10 mm，部件号 G4212-60008）。

采用 Agilent 708-DS 溶出度仪，并将 Agilent 1290 Infinity Flexible Cube（部件号 G4227A）用于溶出度仪与在线液相色谱系统之间的样品传输。1290 Infinity Flexible Cube 模块如图 1 所示，其中包括一个往复单缸活塞泵和快速更换阀，可通过 CDS 软件对阀位及泵液时间、速率进行控制。



图 1. Agilent 1290 Infinity Flexible Cube 模块

在本实验中，仪器设备连接示意图如图 2 所示。其中，Flexible Cube 模块作为在线液相色谱系统与溶出度仪之间的桥梁，分别将 6 个溶出取样针固定在溶出度仪端的多功能取样架上，取样针前端安装全通过滤器（安捷伦全通过滤器，UHMWPE，部件号 17-4003），另一端通过管线连接至 Flexible Cube 的快速更换阀。快速更换阀中 1-6 阀位分别对应 1-6 号溶出杯，再由管线连接 Flexible Cube 出口与在线液相色谱系统外置阀，完成从溶出度仪与在线液相色谱系统之间的管路连接。

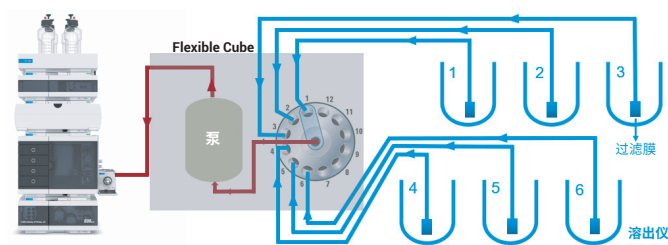


图 2. 仪器设备连接示意图

软件采用 Agilent OpenLab CDS 2.7 版和安捷伦在线液相色谱监测软件 1.1 版。

标准品制备

取丙戊酸钠对照品适量，用纯化水稀释得到丙戊酸钠含量为 0.3 mg/mL 的丙戊酸钠标准溶液。

液相色谱条件开发及实验

本溶出实验针对不同规格的丙戊酸钠片剂进行，进行线性溶出度测试前，先使用丙戊酸钠标准溶液，开发快速的 HPLC 方法明确色谱条件。

色谱柱	Poroshell EC C18 3.0 mm × 50 mm, 2.7 μm, 部件号 699975-302
柱温	45 °C
检测波长	210 nm
进样量	20 μL
流速	2.0 mL/min
流动相	10 mM 磷酸二氢钠 pH 2.0: 乙腈 = 60:40
运行时间	1.0 min
丙戊酸钠标准溶液	取丙戊酸钠对照品适量，用纯化水稀释至丙戊酸钠含量为 0.3 mg/mL 的溶液

液相色谱结果

在拟定色谱条件下，取丙戊酸钠标准溶液进样分析，得到如下所示图谱。如图所示，目标物丙戊酸钠峰型良好。主峰保留时间为 0.382 min，单针进样时间可缩短至 1 min 之内。

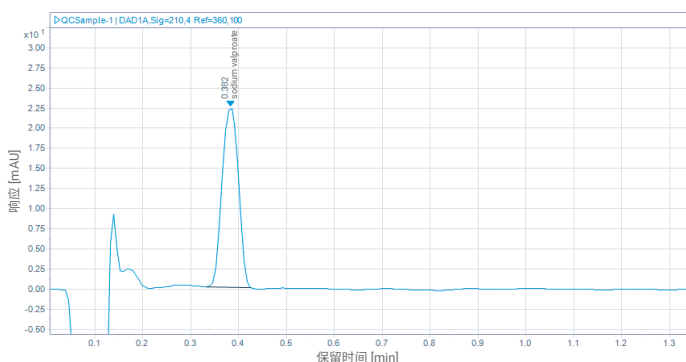


图 3. 待测丙戊酸钠标准溶液 HPLC 图谱

管路测试

本实验将 Flexible Cube 作为样品传输装置整合至在线液相色谱系统中，利用 Flexible Cube 的快速更换阀灵活切换不同的溶出流路，再通过泵完成不同溶出液的置换及传输。考虑到连接管路的死体积以及管路中可能存在的液体扩散对测试准确度的影响，在实施溶出实验之前，首先对溶液传输所需的时间进行考察。

使用乙腈充分冲洗整个流路，然后将管路置于配制的丙戊酸钠标准溶液中；在 Flexible Cube 流速设定为 4.0 mL/min 的情况下，将溶液收集到进样小瓶中，且每隔 7.5 s 更换一次进样小瓶（每瓶收集 0.5 mL 溶液），连续收集 7.5–150 s 之间的溶液；然后使用上述色谱条件对收集的样品逐一分析；对丙戊酸钠峰面积随取样时间的变化进行统计分析，计算出目标化合物含量的准确度并绘制准确度随取样时间变化的趋势图。结果如表 1 和图 4 所示。从中可以看出，随着泵液时间逐渐增加，管路中的丙戊酸钠含量呈增加趋势，在 82.5 s 后含量准确度大于 99.5% 且保持稳定，可认为此时收集的液体能够准确反映目标化合物的浓度。因此，每次管路切换后，冲洗时间应尽量接近 82.5 s (1.375 min)，以保证溶出液能够充分置换管路中的原溶液，从而提供准确的溶出测试结果。

表 1. 待测组分峰面积变化趋势

进样时间 (S)	峰面积	准确度
7.5	0	0.00%
15.0	0	0.00%
22.5	2.806	3.16%
30.0	27.025	30.41%
37.5	59.359	66.79%
45.0	79.404	89.34%
52.5	85.623	96.34%
60.0	87.235	98.15%
67.5	87.969	98.98%
75.0	88.299	99.35%
82.5	88.522	99.60%
90.0	88.691	99.79%
97.5	88.742	99.85%
105.0	88.832	99.95%
112.5	88.935	100.06%
120.0	88.899	100.02%
127.5	89.030	100.17%
135.0	88.957	100.09%
142.5	89.204	100.37%
150.0	88.915	100.04%

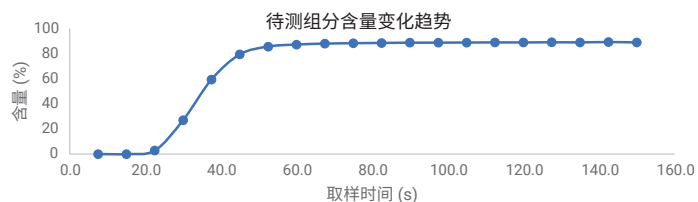


图 4. 待测组分准确度变化趋势图

在线溶出检测实验设定

溶出实验是评估口服固体制剂中药物释放速率和程度的重要手段。药物的溶出过程包括初始的快速释放阶段，以及随后的缓慢释放阶段和最终的稳定阶段。因此，根据药物特性和剂型选择合适的取样时间对于溶出测试的准确度至关重要。

以缓释片剂和速释片剂为例，缓释片剂通常需要数小时在体内完全释放，通常第一个取样点在 1 小时左右，用于评估药物的初始释放速度；随后可根据药物释放特性每隔 1 小时或 2 小时设定一个取样点，直至药物完全释放。这样的设置能够提供药物释放的详细轮廓，并确保药物在规定时间内达到预期的溶出百分比。在传统溶出实验中，每个取样点需要手动完成样品收集、处理及转移，而缓释片剂取样会持续 24 小时或更长时间，分析人员的长时间疲劳操作可能降低取样准确度，增加操作失误的风险。与缓释片剂有所不同，速释片剂旨在快速释放药物，通常在 30 分钟内释放大部分药物。第一个取样点设定在 5 分钟内，以评估药物的初始释放速度；随后在 5-30 分钟之间设置多个取样点以捕捉药物释放的关键阶段。高频率取样过程中的手动操作面临更严峻的挑战，尤其是在取样的准确度和一致性方面。由于速释片剂的溶出速度快，取样时间误差以及不同操作人员的取样行为差异都有可能错过药物快速释放的关键阶段。

将安捷伦在线液相色谱系统与 Flexible Cube 联用，可实现全自动化溶出测试取样及检测，在提高数据精度的同时，大幅提升实验效率和数据质量。

本实验分别以丙戊酸钠缓释片剂和速释片剂为例，测试安捷伦在线液相色谱系统与 Flexible Cube 联用方案的可行性和准确度。

丙戊酸钠缓释片剂溶出实验

根据丙戊酸钠缓释片剂的释放特性，本实验设定 4 个取样点，平行进行 6 组溶出实验，具体取样安排如表 2 所示：

表 2. 丙戊酸钠缓释片剂溶出实验 时间安排

时间 (min)	第 1 点	第 2 点	第 3 点	第 4 点
第 1 杯	01h00m	03h00m	06h00m	12h00m
第 2 杯	01h05m	03h05m	06h05m	12h05m
第 3 杯	01h10m	03h10m	06h10m	12h10m
第 4 杯	01h15m	03h15m	06h15m	12h15m
第 5 杯	01h20m	03h20m	06h20m	12h20m
第 6 杯	01h25m	03h25m	06h25m	12h25m

根据表 2 所示的取样时间，丙戊酸钠缓释片剂溶出实验中的最小取样间隔为 5 min；可先进行充分的管路清洗和置换，然后利用在线 LC 系统实时进行溶出度分析。例如，针对前 3 个取样点的具体实验时间安排如图 5 所示。

缓释片剂分析流程	1 小时	1 小时 5 分钟	1 小时 10 分钟
Flexible Cube	使用 1 号杯冲洗管路	使用 2 号杯冲洗管路	使用 2 号杯冲洗管路
LC 系统	分析 1 号杯样品	分析 2 号杯样品	分析 3 号杯样品

图 5. 丙戊酸钠缓释片剂前 3 个取样点的运行流程

考虑到第 1 个设定时间点最后一杯的取样时间 (01h25m) 与第 2 个设定时间点第 1 杯的取样时间 (03h00m) 之间的间隔较长，可利用在线液相色谱监测软件设定 Sleep Method (休眠方法)，在空闲时间段内使 LC 系统以较低流速运行；并设定 Wakeup Method (唤醒方法) 用于进样采集前的色谱系统平衡。具体设定如图 6 所示。

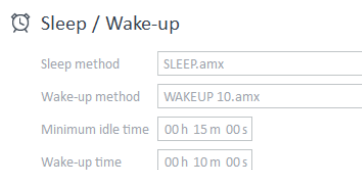


图 6. 在 Online LC Monitoring Software 中设定 Sleep/Wakeup Method

完成 CDS 采集方法设定后，于在线液相色谱监测软件中设定样品收集方式、检测方法以及具体取样时间，具体设定如图 7 所示。在本实验中，设定的溶出液收集方式为 Direct Injection (直接进样)，详见图 8。在不同的应用场景下，分析人员也可以利用在线液相色谱监测软件设定其他样品收集方式。例如，可以在数据采集的同时将样品收集至进样小瓶中，或者将溶出液稀释后进样。

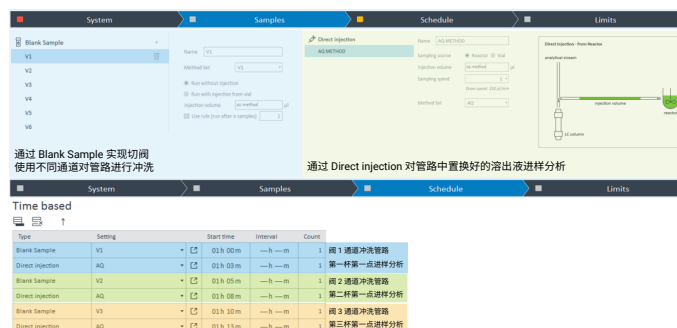


图 7. Online LC monitoring Software 设定采集方法、取样方式及触发时间

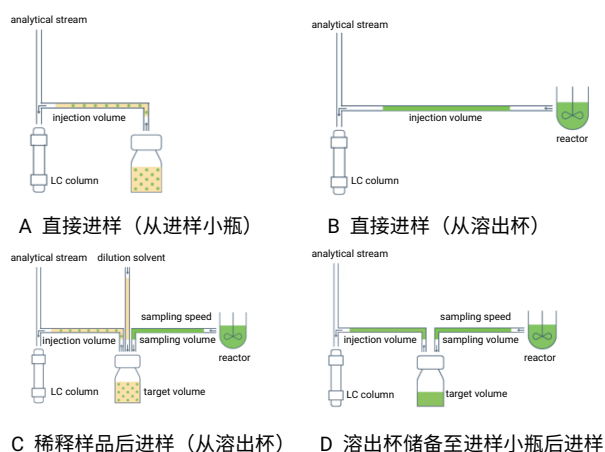


图 8. 在线液相色谱系统不同取样及分析模式

完成上述设定后，只需保证溶出度仪和在线液相色谱系统同步开始运行，并将溶出度仪的自动投药间隔设定为 5 min，即可全自动完成丙戊酸钠缓释片剂的溶出测试及数据处理。

按照实验部分所述的条件对丙戊酸钠缓释片剂进行溶出测试。利用在线液相色谱监测软件，根据预设的处理方法对采集的数据进行自动处理，然后统计数据并绘制溶出曲线。

表 3. 缓释片剂取样点峰面积统计

测试时间 (小时)	第 1 杯	第 2 杯	第 3 杯	第 4 杯	第 5 杯	第 6 杯	平均值	RSD
1	33.098	34.539	34.087	32.559	32.657	33.452	33.399	2.4%
3	62.096	63.112	62.433	63.559	65.398	63.699	63.383	1.8%
6	94.639	96.89	95.585	96.249	95.306	94.282	95.492	1.0%
12	114.753	116.493	115.281	114.416	112.306	113.073	114.387	1.3%

表 4. 缓释片剂溶出度结果

测试时间 (小时)	第 1 杯	第 2 杯	第 3 杯	第 4 杯	第 5 杯	第 6 杯	平均值
1	23.9%	24.9%	24.6%	23.5%	23.6%	24.2%	24.9%
3	44.9%	45.6%	45.1%	45.9%	47.2%	46.0%	47.3%
6	68.4%	70.0%	69.0%	69.5%	68.8%	68.1%	71.2%
12	82.9%	84.1%	83.3%	82.6%	81.1%	81.7%	85.3%

对比同一取样时间的 6 个平行样品，并计算其主峰面积的相对标准偏差 (RSD)，对测试重现性进行评估。结果列于表 4 中。从表中可以看出，取样时间为 1 h 的 6 组平行实验所得目标化合物的峰面积 RSD 值为 2.4%，小于 20% 的要求；且取样时间为 3 h、6 h 和 12 h 时的平行实验所得结果的 RSD 值分别为 1.8%、1.0% 和 1.3%，均小于 10% 的要求。表明在拟定的测试条件下，方法重现性良好，可满足溶出测试要求。

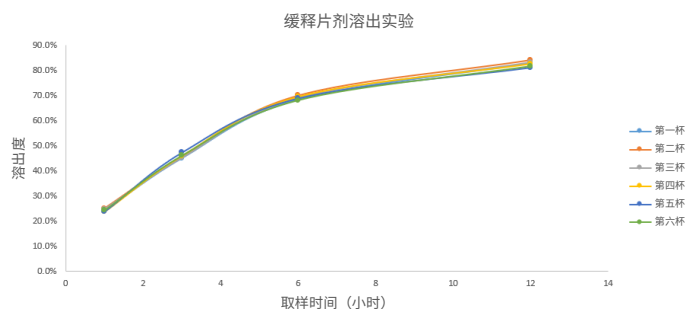


图 9. 缓释片剂溶出曲线

通过对比标准品峰面积，绘制丙戊酸钠缓释片剂的溶出曲线，结果如图 9 所示。结合表 4 所列的数据可知，溶出时间为 1 h、3 h、6 h 和 12 h 时的平均溶出度分别为 24.9%、47.3%、71.2% 和 85.3%，表明在设定的实验时间内，药物最终已基本溶出。

速释片剂溶出实验

与缓释片剂不同，根据丙戊酸钠速释片剂的释放特性，设定了更密集的溶出测试取样时间点。具体而言，同样设定 4 个取样点，对 6 个溶出杯同步进行测定，详见表 5。

表 5. 丙戊酸钠速释片剂溶出实验时间安排

时间 (min)	第 1 点	第 2 点	第 3 点	第 4 点
第 1 杯	3	15	30	45
第 2 杯	5	17	32	47
第 3 杯	7	19	34	49
第 4 杯	9	21	36	51
第 5 杯	11	23	38	53
第 6 杯	13	25	40	55

根据表 5 所示的取样时间安排, 2 个取样点之间的最短时间间隔为 2 min。每次切换溶出杯后, 管路清洗及置换时间为 1.3 min, 而单针进样分析需要 1 min。如果首先进行管路清洗, 然后进行样品分析, 则单次溶出液传输和检测的总时长大于 2 min, 无法满足最短间隔时间的要求。因此, 考虑使样品传输与样品采集同步进行。以表 5 中的前 3 个取样点 (3 min、5 min 和 7 min) 为例, 实验安排如图 10 所示。

速释片剂分析流程	3 分钟	5 分钟	7 分钟
Flexible Cube	使用 1 号杯冲洗管路	使用 2 号杯冲洗管路	使用 3 号杯冲洗管路
LC 系统	-	分析 1 号杯样品	分析 2 号杯样品

图 10. 速释片剂管路清洗及分析流程*

* 为实现更高频率的取样及检测, 速释片剂相较缓释片剂先取样再分析的实验流程有所调整。得益于 Flexible Cube 模块的灵活性, 实验中可独立设置 Flexible Cube 的冲洗管路及 LC 系统的进样分析, 实现下一针管路冲洗与上一次样品检测同步进行。

完成 CDS 采集方法设定后, 需要在在线液相色谱监测软件中设定样品收集方式、检测方法和具体取样时间 (见图 11)。完成所有设定后, 只需保证溶出度仪和在线液相色谱系统同步开始运行, 并将溶出度仪投药间隔设定为 2 min, 即可在 1 小时内完成丙戊酸钠速释片剂的溶出测试及数据处理。

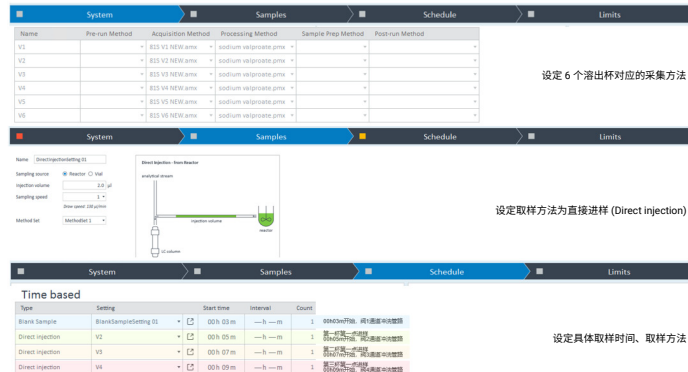


图 11. Online LC monitoring Software 设定采集方法、取样方式及触发时间

按照实验部分所述的条件对丙戊酸钠速释片剂进行溶出测试。实验完成后, 利用在线液相色谱监测软件, 根据预设的处理方法对采集的数据进行自动处理, 然后统计数据并绘制溶出曲线。

对比同一取样时间的 6 个平行样品中目标化合物峰的峰面积, 并计算 RSD, 对测试重现性进行评估。结果如表 6 所示。从表中可以看出, 取样时间为 3 min 时的 6 组平行实验所得目标化合物的峰面积 RSD 值为 1.5%, 小于 20% 的要求; 且取样时间为 15 min、30 min 和 45 min 时的平行实验所得结果的 RSD 值分别为 0.6%、1.0% 和 1.2%, 均小于 10% 的要求。表明在拟定的测试条件下, 方法重现性良好, 可满足溶出测试要求。

表 6. 速释片剂溶出峰面积统计

测试时间 (分钟)	第 1 杯	第 2 杯	第 3 杯	第 4 杯	第 5 杯	第 6 杯	平均值	RSD
3	23.40	22.80	22.69	22.76	23.16	22.48	22.88	1.5%
15	53.76	53.87	53.54	54.49	53.93	53.69	53.88	0.6%
30	54.80	54.79	54.18	54.48	53.43	53.86	54.26	1.0%
45	54.85	54.96	54.72	55.36	53.53	54.33	54.62	1.2%

表 7. 速释片剂溶出度结果

测试时间 (分钟)	第 1 杯	第 2 杯	第 3 杯	第 4 杯	第 5 杯	第 6 杯	平均值
3	42.6%	41.5%	41.3%	41.4%	42.2%	40.9%	41.7%
15	97.9%	98.1%	97.5%	99.2%	98.2%	97.8%	98.1%
30	99.8%	99.8%	98.7%	99.2%	97.3%	98.1%	98.8%
45	99.9%	100.1%	99.6%	100.8%	97.5%	98.9%	99.5%

通过对比标准品峰面积, 绘制丙戊酸钠速释片剂的溶出曲线, 结果如图 12 所示。结合表 7 所列的数据可知, 溶出时间为 3 min 时的溶出度为 41.7%, 15 min 时的溶出度为 98.1%, 且 30-45 min 的溶出度稳定保持在 98% 以上, 表明在设定的实验时间内, 药物最终已完全溶出。

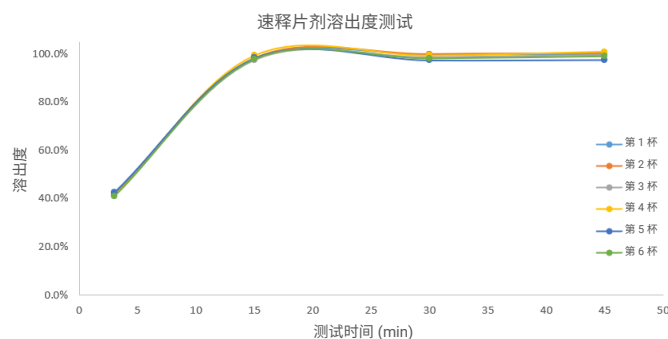


图 12. 速释片剂溶出度图谱

结果与讨论

本实验将安捷伦在线液相色谱系统与 Flexible Cube 模块联用，提供了一种全自动化溶出测试工作流程。其中采用 CDS 软件控制 Flexible Cube，在指定时间完成流路的选择和溶出液的传输，并利用在线液相色谱系统对收集的溶出液进行实时检测。

利用该联用方案对丙戊酸钠缓释片剂和速释片剂进行了溶出测试。在丙戊酸钠缓释片剂溶出测试中，该联用方案展现出良好的灵活性和通用性。用户可根据其具体需求选用不同的样品收集方式，例如在检测的同时将溶出液收集至进样小瓶中，或者灵活调整溶出液的稀释比例以适应不同的检测要求。这种灵活的实验设计不仅优化了实验流程，而且提高了实验数据的可靠性和实用性。在丙戊酸钠速释片剂溶出测试中，由于单次取样最小间隔仅为 2 min，因此利用 Flexible Cube 的高效传输系统，配合在线液相色谱系统的快速检测能力，实现了从样品处理、传输、进样到数据采集的全流程自动化。这一方案不仅确保了高频取样的准确度，而且大幅提升了实验效率和数据质量。

总体而言，安捷伦在线液相色谱系统与 Flexible Cube 模块联用，可实现全自动化溶出测试，优化实验流程、减少人工操作并提高测试精度和效率，为缓释片剂和速释片剂的溶出测试提供了强大的支持。同时，所开发的方案表现出良好的可扩展性和通用性，适用于其他平行反应监控等实验场景，在药物研发和生产中具有广阔的应用前景。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE17838702

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2024
2024年5月30日, 中国出版
5994-7502ZHCN

