

HPLC 双波长法测定复方罗布麻片 I 中泛酸钙和氢氯噻嗪的含量

刘倩倩¹, 谢子立^{2*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

摘要: 目的 建立 HPLC 双波长法测定复方罗布麻片 I 中泛酸钙和氢氯噻嗪的含量。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以含 0.1% 辛烷磺酸钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.0)-乙腈(96 : 4)为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 采用梯度洗脱, 柱温为 35 °C, 检测波长泛酸钙 200 nm、氢氯噻嗪 275 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL。**结果** 泛酸钙和氢氯噻嗪分别在 0.025~0.5 μg($r=0.999\ 6$)和 0.16~3.2 μg($r=1.000\ 0$)内线性关系良好; 平均加样回收率($n=9$)分别为 101.2%(RSD=0.47%)和 101.6%(RSD=0.49%)。**结论** 本法精密度好, 结果准确可靠, 适用于该制剂的质量检验分析。

关键词: 复方罗布麻片 I; 泛酸钙; 氢氯噻嗪; 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(2017)12-1668-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.005

引用本文: 刘倩倩, 谢子立. HPLC 双波长法测定复方罗布麻片 I 中泛酸钙和氢氯噻嗪的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1668-1671.

Determination of Calcium Pantothenate and Hydrochlorothiazide in Compound Kendir Leaves Tablet I by Dual Wavelengths of HPLC

LIU Qianqian¹, XIE Zili^{2*} (1.School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2.Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a dual wavelengths of HPLC method for the determination of calcium pantothenate and hydrochlorothiazide in Compound Kendir Leaves tablet I. **METHODS** The Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase A [0.1% octane sulfonic acid sodium (adjust pH to 3.0 with phosphoric acid)-acetonitrile (96 : 4)]-methanol as mobile phase B with gradient elution. The column temperature was set as 35 °C and the detection wavelength was set at 200 nm for calcium pantothenate and 275 nm for hydrochlorothiazide. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. **RESULTS** The linear range was good within 0.025–0.5 μg ($r=0.999\ 6$) for calcium pantothenate, 0.16–3.2 μg ($r=1.000\ 0$) for hydrochlorothiazide, respectively. The average recoveries($n=9$) were 101.2% (RSD=0.47%) and 101.6% (RSD=0.49%), respectively. **CONCLUSION** The method is accurate and reliable for the quality control of this compound preparation.

KEY WORDS: Compound Kendir Leaves tablet I; calcium pantothenate; hydrochlorothiazide; HPLC

复方罗布麻片 I 是由罗布麻叶、野菊花、防己以及硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪等多味中西药组成的复方制剂^[1-2], 为治疗高血压病的常用药物, 临床应用多年, 效果明显^[3]。其中泛酸钙为钙离子拮抗剂, 抑制钙离子内流, 减少血管平滑肌的张力及其对内源性加压物质的反应性, 而产生降压作用; 氢氯噻嗪为利尿降压药, 能增加硫酸双胍屈嗪的降压作用以及降低水钠潴留的不良反应^[4]。复方罗布麻片 I 收载于国家药品标准化学药品地标升国标第十一册^[5], 现行标准中只收载了氢氯噻嗪^[6]的含量测定, 该质量标准过于简单, 未对泛酸钙的含量进行控制, 不利于药物的质量控制。本

实验同时测定复方罗布麻片 I 中的泛酸钙和氢氯噻嗪含量, 为复方罗布麻片 I 的标准制订提供参考^[7]。

1 仪器与试剂

LC-20AD 系列高效液相色谱仪(日本岛津公司); AG-135 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 泛酸钙对照品(批号: 100370-201402, 纯度: 97.5%)、氢氯噻嗪对照品(批号:100309-201103, 纯度: 99.8%)均来自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 辛烷磺酸钠为离子对色谱用试剂(美国天地有限公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。复方罗布麻片 I (厂家

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项项目(2013YQ220643)

作者简介: 刘倩倩, 女, 硕士生 Tel: 18356063357 E-mail: 1137026954@qq.com *通信作者: 谢子立, 男, 副主任药师 Tel: (0551)63358051 E-mail: 1536838165@qq.com

A, 批号: 151003; 厂家 B, 批号: 151231; 厂家 C, 批号: 150502; 厂家 D, 批号: 140301)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 0.1% 辛烷磺酸钠溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.0)-乙腈(96:4)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱(0~15 min, 99%A; 15~30 min, 99%→45%A; 30~40 min, 45%→10%A; 40~40.1 min, 10%→99%A; 40.1~70 min, 99%A)。柱温 35 °C, 检测波长: 泛酸钙 200 nm, 氢氯噻嗪 275 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液的制备 分别精密称取泛酸钙对照品、氢氯噻嗪对照品适量, 加流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液使溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.125 mg 的泛酸钙和 0.8 mg 的氢氯噻嗪混合溶液, 作为对照品储备液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密量取“2.2.1”项下的对照品储备液 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量(约相当于氢氯噻嗪 4 mg) 置 25 mL 量瓶中, 加流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液适量超声 20 min 使溶解, 用流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例制备不含泛酸钙、氢氯噻嗪的阴性对照溶液, 按“2.2.3”项下的方法同法处理。

2.3 专属性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 10 μL 测定。结果显示, 阴性对照溶液不干扰混合对照品和供试品溶液的测定, 见图 1。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下的对照品储备液 0.5, 1, 3, 5, 7, 10 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 用流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述溶液 10 μL, 分别注入液相色谱仪中, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 分别以相

应对照品的浓度(X)为横坐标, 以泛酸钙、氢氯噻嗪峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得泛酸钙、氢氯噻嗪回归方程分别为: $Y=10 \times 10^5 X - 2016.4$ ($r=0.9999$), $Y=4 \times 10^6 X + 10261$ ($r=1.0000$), 结果表明: 泛酸钙和氢氯噻嗪的线性范围分别为 0.025~0.5 μg 和 0.16~3.2 μg, 线性关系良好。

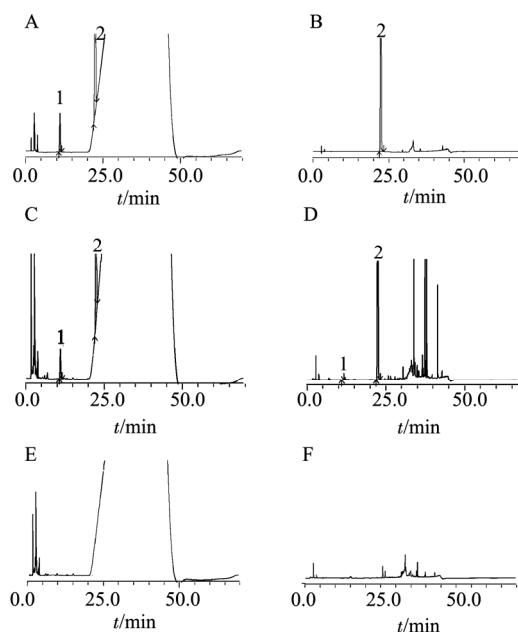


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液(200 nm); B-混合对照品溶液(275 nm); C-供试品溶液(200 nm); D-供试品溶液(275 nm); E-阴性对照溶液(200 nm); F-阴性对照溶液(275 nm); 1-泛酸钙; 2-氢氯噻嗪。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution(200 nm); B-standard solution(275 nm); C-sample solution(200 nm); D-sample solution(275 nm); E-negative solution(200 nm); F-negative solution(275 nm); 1-calcium pantothenate; 2-hydrochlorothiazide.

2.5 检测限与定量限

以信噪比(S/N)为 3:1 和 10:1 为基准测得各化合物的检测限和定量限, 泛酸钙的检测限为 1.0 ng, 定量限为 3.3 ng; 检测限是由线性范围最低的浓度(0.0025 mg·mL⁻¹)稀释 25 倍所得最终浓度为 0.0001 mg·mL⁻¹; 氢氯噻嗪的检测限为 0.4 ng, 定量限为 1.3 ng; 检测限是由线性范围最低的浓度(0.016 mg·mL⁻¹)稀释 400 倍所得最终浓度为 0.00004 mg·mL⁻¹。

2.6 仪器精密度试验

分别精密量取“2.2.2”项下的混合对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 连续测定 6 次, 记录峰面积, 泛酸钙、氢氯噻嗪的 RSD 分别为 0.31%(n=6) 和 0.10%(n=6), 结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液，室温放置，分别取 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 的供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱峰面积，泛酸钙、氢氯噻嗪的 RSD 分别为 0.29%(n=7)和 0.12%(n=7)，结果表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批供试品(批号：151003)6 份，按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱峰面积，结果泛酸钙、氢氯噻嗪的 RSD 分别为 0.84%(n=6)和 0.44%(n=6)，结果表明本法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

采用加样回收法，取已知含量的同一批复方罗布麻片 I，研细，精密称取约相当于 2.5 片的量，置 50 mL 量瓶中，共 9 份，依次每 3 份分别加入对照品的量为样品含量的 40%，50%及 60%，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，测定，结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果(n=9)

成分	取样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
泛酸钙	0.344 2	0.636 4	0.529 2	1.172 3	101.25	101.2	0.47
	0.347 8	0.643 1	0.529 2	1.181 6	101.77		
	0.340 9	0.630 3	0.529 2	1.164 7	100.97		
	0.348 3	0.644 0	0.661 5	1.313 1	101.15		
	0.342 6	0.633 4	0.661 5	1.301 4	100.97		
	0.339 9	0.628 5	0.661 5	1.301 4	101.72		
	0.344 8	0.637 5	0.793 8	1.445 5	101.78		
	0.343 1	0.634 4	0.793 8	1.431 2	100.38		
	0.346 6	0.640 8	0.793 8	1.441 6	100.88		
氢氯噻嗪	0.344 2	4.100 2	3.152 9	7.261 2	100.26	101.6	0.49
	0.347 8	4.209 7	3.152 9	7.421 5	101.87		
	0.340 9	4.200 1	3.152 9	7.400 3	101.50		
	0.348 3	4.192 9	3.941 1	8.205 2	101.81		
	0.342 6	4.159 2	3.941 1	8.168 1	101.72		
	0.339 9	4.188 1	3.941 1	8.202 8	101.87		
	0.344 8	4.139 9	4.729 3	8.948 7	101.68		
	0.343 1	4.156 8	4.729 3	8.963 3	101.63		
	0.346 6	4.166 4	4.729 3	8.973 1	101.64		

2.10 样品含量测定

分别取不同厂家的复方罗布麻片 I，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，再分别精密

量取供试品溶液和对照品溶液 10 μL 进样，测定峰面积，按外标法计算含量，结果见表 2。

表 2 复方罗布麻片 I 中泛酸钙和氢氯噻嗪的含量(n=4)

Tab. 2 The contents of calcium pantothenate and hydrochlorothiazide in Compound Kendir Leaves tablet I (n=4)

批号	泛酸钙	氢氯噻嗪
151003	101.54%	102.06%
151231	129.70%	99.94%
150502	97.44%	99.39%
140301	61.12%	86.70%

3 讨论

3.1 溶剂及流动相的选择

按照中国药典^[8]及相关文献^[9-11]，虽然泛酸钙易溶于水，但氢氯噻嗪在水中不溶，乙醇中微溶，甲醇中溶解，由于溶剂[流动相 A-甲醇(20:80)混合溶液]中含甲醇比例较大，故可用该溶剂直接稀释定容。泛酸钙在溶液中易于离子化，反相色谱中很难在 C₁₈ 柱上保留，采用在流动相中加入离子对试剂辛烷磺酸钠，使其与泛酸钙中的离子结合生成弱极性的化合物，从而加大在固定相中的保留，有效地与其他杂质分开。

3.2 供试品超声时间的选择

复方罗布麻片 I 作为一种典型的由多味中西药组成的复方制剂，为避免制剂中有效成分无法完全溶出，对供试品超声时间做了比较，以超声时间(min)为横坐标，以泛酸钙和氢氯噻嗪的百分含量(%)为纵坐标，结果见图 3。由图可知，泛酸钙和氢氯噻嗪在超声 15~25 min 时基本完全溶解，在超声 30 min 后泛酸钙含量略微下降，因此建议超声 20 min，确保样品能完全溶解并稳定。

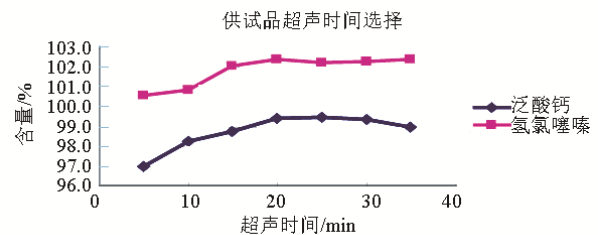


图 3 泛酸钙和氢氯噻嗪超声时间的选择

Fig. 3 The choose of ultrasonic time about calcium pantothenate and hydrochlorothiazide

3.3 波长的选择

泛酸钙在 230 nm 以上无紫外发色基团，通过测定泛酸钙的紫外吸收光谱，发现泛酸钙最大吸

收在 195 nm。色谱条件中流动相为缓冲溶液与甲醇进行梯度洗脱, 甲醇的截止波长为 205 nm, 测定波长的选择存在一定难度。经色谱条件中梯度洗脱表可知, 在泛酸钙出峰时间时, 甲醇的比例仅占 1%, 即为流动相 A-甲醇(99:1), 甲醇的截止波长对泛酸钙在 200 nm 下测定无干扰。为考察本次实验耐用性, 避免不同仪器造成的差异, 以流动相 A-甲醇(95:5)为考察泛酸钙截止波长的梯度洗脱溶液, 经紫外扫描截止波长为 190 nm 以下, 而在 195~240 nm 之间紫外吸收为 0.3574~0.0730, 其中 200 nm 的紫外吸收为 0.1895, 能有效避免甲醇截止波长对泛酸钙测定的影响。文献报道泛酸钙的检测波长多在 210 nm, 经实验知, 该色谱条件下 210 nm^[12]处的峰面积比 195 nm 处的低了近三分之一, 由于泛酸钙含量较低, 不利于该组分的准确积分, 而 200 nm 处的峰面积只略低于 195 nm, 且积分准确性高(RSD=0.35%, n=6), 同时有效避免流动相基线噪音及样品中其他成分造成的干扰^[13], 最终选择 200 nm 作为泛酸钙的检测波长。

氢氯噻嗪的最大吸收波长经紫外扫描可知为 271 nm, 由图 1 可知, 200 nm 处色谱中 20 min 后开始出现末端吸收, 故氢氯噻嗪的检测波长不选择 200 nm。由于处方中氢氯噻嗪的加入量为泛酸钙的 64 倍, 在低波长处氢氯噻嗪的吸收值过高。参考相关文献^[14]且制剂中的辅料在 275 nm 无干扰, 因此采用 275 nm 作为氢氯噻嗪的检测波长。综上, 最终选择双波长法^[15]测定复方罗布麻片 I 中的泛酸钙(200 nm)和氢氯噻嗪(275 nm)的含量。

REFERENCES

- [1] ANDRIEUX P, FONTANNAZ P, KILINC T, et al. Pantothenic acid (vitamin B5) in fortified foods: comparison of a novel ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and a microbiological assay [J]. J AOAC Int, 2012, 95(1): 143-148.
- [2] XY H, TANG W G, HUANG C Y, et al. HPLC determination of the dissolution of compound amlodipine, valsartan and

hydrochlorothiazide tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(1): 46-51.

- [3] 刘海清. HPLC 测定复方罗布麻片中罗布麻甲素的含量[J]. 中成药, 2004, 26(5): 91-92.
- [4] WANG L N, ZHANG X L, DING J. Detection of main chemical composition of Compound Kendir Tablets I by HPLC [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2011, 30(2): 83-85.
- [5] LU X M. Simultaneous determination of content and uniformity of hydrochlorothiazide and promethazine hydrochloride in Compound Kendir Leaves Tablets I by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2014, 17(11): 1891-1893.
- [6] WANG J P, WANG M Z. Uncertainty for determination of hydrochlorothiazide in Zhenju Jiangya tablets by HPLC [J]. Chin Lic Pharm(中国执业药师), 2016, 13(8): 27-31.
- [7] XU B, XI L, GAO L. HPLC determination of vitamin B₁, vitamin B₆, pantothenic acid and hydrochlorothiazide in Compound Reserpine tablets [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(11): 1906-1908.
- [8] 中国药典. 二部[S]. 2015: 944, 556.
- [9] YANG X L, QIU D L. Determination of two components in nifedipine hydrochlorothiazide tablets by HPLC gradient elution method [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2015, 27(8): 57-58.
- [10] ZHANG Z. Hydrochlorothiazide and dihydralazine sulfate in Compound Reserpine tablets simultaneously determined by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2011, 15(10): 1211-1212.
- [11] CHENG Z, WAN Q, GUAN Y Y, et al. Determination of hydrochlorothiazide, promethazine hydrochloride and reserpine in compound reserpine tablets by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2010, 14(1): 38-40.
- [12] ZHU L S, LIU J K, WU P Y, et al. Simultaneous Determination of Dihydralazine Sulfate et al Five Components in Compound Reserpine Tablets by HPLC [J]. Mod Sci Ins(现代科学仪器), 2013(4): 193-196.
- [13] TANG Q H, LIN H, ZHANG Y F, et al. Simultaneous determination of hydroxysaffor yellow A and chlorogenic acid in Fufang Honghua Spray by dual-wavelength HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 325-328.
- [14] CHEN X L. Determination of guanoxan sulfate, chloroquine phosphate hydrochloride, vitamin B₁ and vitamin B₆ in Compound Dibazol and Hydrochlorothiazide capsules by HPLC [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2010, 11(6): 453-456.
- [15] WANG B, XU Y Y, LIN Y. Simultaneous determination of seven components in Xiaopiling granule by HPLC wavelength switching combined gradient elution method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(4): 571-574.

收稿日期: 2017-05-16

(本文责编: 李艳芳)