

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.11.016

高效液相色谱双波长法测定复方罗布麻片 I 中 3 组分含量

刘倩倩, 蒋磊[△]

(安徽省第二人民医院, 安徽 合肥 230041)

摘要:目的 建立测定复方罗布麻片 I 中泛酸钙、氢氯噻嗪及维生素 B₆ 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.12% 庚烷磺酸钠(A, 冰醋酸调 pH 至 3.0) - 乙腈(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 °C, 检测波长为 200 nm(泛酸钙)和 275 nm(其他), 进样量为 20 μL。结果 泛酸钙质量浓度在 1.333 ~ 13.350 μg/mL ($r=0.9999$), 氢氯噻嗪质量浓度在 7.827 ~ 78.270 μg/mL ($r=1.0000$), 维生素 B₆ 质量浓度在 2.546 ~ 25.460 μg/mL ($r=1.0000$) 范围内与峰面积线性关系良好;泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B₆ 的加样回收率分别为 100.85%, 99.67%, 100.74%, RSD 分别为 1.31%, 0.44%, 1.36% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、重复性好、结果准确, 可用于复方罗布麻片 I 的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 双波长; 复方罗布麻片 I; 泛酸钙; 氢氯噻嗪; 维生素 B₆; 含量测定

中图分类号: R927.2; R972+.4

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)11-0056-03

Content Determination of Three Components in Compound Luobuma Tablets I by Dual - Wavelengths HPLC

LIU Qianqian, JIANG Lei

(Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Hefei, Anhui, China 230041)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for content determination of calcium pantothenate, hydrochlorothiazide and pyridoxine hydrochloride in Compound Luobuma Tablets I. **Methods** The chromatographic column was Kromasil C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.12% heptane sulfonate acid sodium(A, pH was adjusted to 3.0 with glacial acetic acid) - acetonitrile(B) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 °C, the detection wavelengths were 200 nm(calcium pantothenate) and 275 nm(others), and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of calcium pantothenate, hydrochlorothiazide and pyridoxine hydrochloride were 1.335 - 13.350 μg/mL ($r=0.9999$), 7.827 - 78.270 μg/mL ($r=1.0000$) and 2.546 - 25.460 μg/mL ($r=1.0000$), respectively. The recoveries of calcium pantothenate, hydrochlorothiazide and pyridoxine hydrochloride were 100.85% ($RSD=1.31\%$, $n=6$), 99.67% ($RSD=0.44\%$, $n=6$), 100.74% ($RSD=1.36\%$, $n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, repeatable and accurate, which can be used for the quality control of Compound Luobuma Tablets I.

Key words: HPLC; dual - wavelength; Compound Luobuma Tablets I; calcium pantothenate; hydrochlorothiazide; pyridoxine hydrochloride; content determination

复方罗布麻片 I 是由罗布麻叶、野菊花、防己 3 味中药及泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B₆、维生素 B₁、硫酸双肼屈嗪、盐酸异丙嗪组方的复方制剂, 是临床常用降压药, 药效协同^[1-3], 成分复杂^[4-5]。现行质量标准中仅有氢氯噻嗪^[6-7]的含量测定和盐酸异丙嗪的薄层鉴别, 过于简单, 不利于产品质量的控制。本研究中参考文献[8-11], 分析了极性及稳定性等性质来确定溶剂、固定相及流动相, 最终采用高效液相色谱双波长法同时测定该复方制剂中泛酸钙、氢氯噻嗪及维生素 B₆ 的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AD 型高效液相色谱仪, 配有 LC-20AD 型紫外可见光度检测器(日本岛津公司); Elmasonic P 60H 型超声仪(德国 Elmasonic 公司, 功率为 320 W, 频率为

80 kHz); XS-105 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为十万分之一); BINDER PD60 型电热干燥箱(德国 Binder 公司)。

1.2 试药

泛酸钙对照品(批号为 100370-201402, 纯度为 97.5%), 氢氯噻嗪对照品(批号为 100309-201103, 纯度为 99.8%), 维生素 B₆ 对照品(批号为 100116-201103, 纯度为 99.9%), 均购自中国食品药品检定研究院; 复方罗布麻片 I(某药业集团有限公司, 批号分别为 151001, 151002, 151003); 庚烷磺酸钠、乙腈、甲醇均为色谱纯, 水和冰醋酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);

第一作者: 刘倩倩, 女, 硕士研究生, 药师, 研究方向为药品质量与控制, (电子信箱)1137026954@qq.com。

[△]通信作者: 蒋磊, 男, 在读博士研究生, 副主任药师, 研究方向为药剂学与医院药学管理, (电子信箱)435045881@qq.com。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 ~ 30	96	4
30.01 ~ 60	92	8
60.01 ~ 75	96	4

流动相:0.12% 庚烷磺酸钠(A,冰醋酸调 pH 至 3.0) – 乙腈(B),梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.0 mL/min;柱温:35 °C;检测波长:泛酸钙 200 nm,其他 275 nm;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

对照品贮备液:取泛酸钙对照品 12.5 mg, 氢氯噻嗪对照品 16.0 mg, 维生素 B₆ 对照品 12.5 mg, 精密称定, 分别置 50 mL, 10 mL, 25 mL 容量瓶中, 泛酸钙和维生素 B₆ 加流动相溶解稀释, 氢氯噻嗪先加 2 mL 甲醇超声溶解, 再加流动相稀释至刻度, 即得对照品贮备液 A, B, C。

对照品溶液:精密量取上述对照品贮备液 A, B, C 各 1 mL, 分别置 10, 100, 10 mL 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 即得对照品溶液 A, B, C。

供试品溶液:取本品 20 片, 研细, 取粉末适量(约相当于氢氯噻嗪 3.2 mg)精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇适量, 加流动相适量, 超声处理 30 min, 使其溶解, 加流动相稀释至刻度, 过滤, 即得。

阴性对照品溶液:按处方比例制备不含泛酸钙、氢氯噻嗪及维生素 B₆ 的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验:取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量, 分别按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果对照品溶液与供试品溶液色谱在相同保留时间处有对应色谱峰出现, 阴性对照无干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察及检测限与定量限测定:分别精密吸取对照品贮备液 A, B, C 各 1, 3, 5, 10, 15, 20 mL, 分别置 50 mL 容量瓶中, 流动相定容, 按 2.1 项下色谱条件进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标、对照品质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归。分别以信噪比(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。结果见表 2。

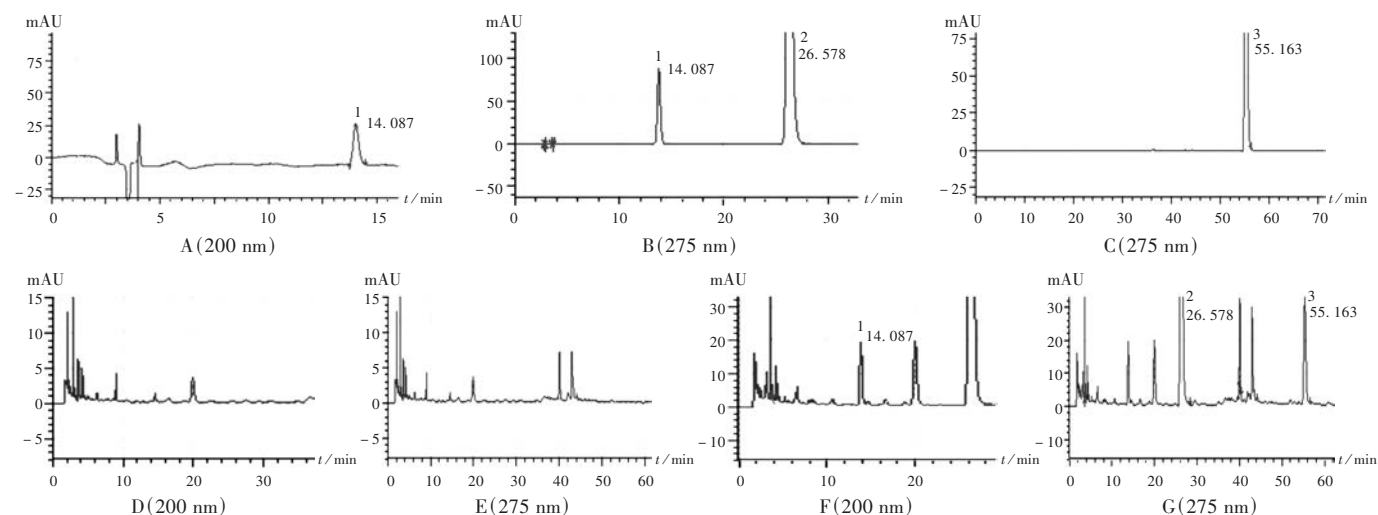
表 2 各被测成分线性关系考察、检测限及定量限测定结果 (n=6)

Tab. 2 Linear ranges of three components and the results of LOQ and LOD (n=6)

成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	检测限(μg)	定量限(μg)
泛酸钙	$Y = 1 \times 10^7 X + 191.91$	0.999 9	1.335 ~ 13.350	1.068	3.338
氢氯噻嗪	$Y = 4 \times 10^7 X + 9880.2$	1.000 0	7.827 ~ 78.270	0.037	0.122
维生素 B ₆	$Y = 1 \times 10^7 X + 23.458$	1.000 0	2.546 ~ 25.460	0.141	0.509

精密密度试验:分别精密量取上述对照品溶液 A, B, C 各 20 μL, 注入液相色谱仪, 连续测定 6 次, 记录峰面积。结果泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B₆ 峰面积的 RSD 分别为 0.34%, 0.12%, 0.08% (n=6), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B₆ 峰面积的 RSD 分别为



1. 泛酸钙 2. 氢氯噻嗪 3. 维生素 B₆

A - C. 对照品溶液 D, E. 阴性对照品溶液 F, G. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. calcium pantothenate 2. hydrochlorothiazide 3. pyridoxine hydrochloride

A - C. Reference solution D, E. Negative reference solution F, G. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

1.18%, 0.35%, 0.31% ($n=6$), 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批(批号为151001)样品6份,依法制备供试品溶液,以外标法计算泛酸钙、氢氯噻嗪及维生素B₆的含量。结果含量的RSD分别为0.31%, 0.29%, 0.53% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为151001)样品1片,研细取粉末,置50 mL容量瓶中,依法制备供试品溶液,分别加入对照品溶液适量,进样20 μ L,测定含量,并计算回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 3 Results of the recovery test ($n=6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
泛酸钙	0.682	0.494	1.187	102.23	100.85	1.31
	0.666	0.494	1.161	100.20		
	0.671	0.617	1.283	99.19		
	0.677	0.617	1.292	99.68		
	0.679	0.741	1.434	101.89		
	0.678	0.741	1.433	101.89		
氢氯噻嗪	4.288	3.099	7.372	99.52	99.67	0.44
	4.189	3.099	7.299	100.36		
	4.225	3.874	8.076	99.41		
	4.261	3.874	8.105	99.23		
	4.272	4.649	8.924	100.06		
	4.267	4.649	8.890	99.44		
维生素B ₆	1.105	1.041	2.155	100.86	100.74	1.36
	1.079	1.041	2.107	98.75		
	1.089	1.301	2.385	99.62		
	1.098	1.301	2.411	100.92		
	1.101	1.561	2.699	102.37		
	1.100	1.561	2.691	101.92		

2.4 样品含量测定

取样品(批号分别为151001, 151002, 151003),依法制备供试品溶液,分别精密量取20 μ L,进样测定峰面积,按外标法计算含量。结果3批样品中泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素B₆的平均含量分别为43.26%, 95.54%, 52.38%。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

曾比较Kromasil C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Phenomenex Gemini C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Agilent 5HC C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), Waters Symmetry Shield C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)的色谱图,以分离度为优化指标,结果4种色谱柱的分离度分别为3.125, 1.875, 3.075, 1.950,故色谱柱选择Kromasil C₁₈柱。

3.2 溶剂选择

参考文献[12-13],氢氯噻嗪在水中不溶,在乙醇

中微溶。流动相中有机相比比例小,故先采用适量甲醇超声溶解,加流动相定容。泛酸钙极不稳定,易降解,水溶液中显中性或弱碱性,流动相为酸性环境,故泛酸钙极易降解,需要及时配制。样品中含有多种中药,成分复杂,且流动相中离子对浓度大,故应对色谱柱进行保护。

3.3 波长选择

因泛酸钙无最大吸收波长,故于200 nm波长处末端吸收测定含量,另2种物质氢氯噻嗪和维生素B₆的最大吸收波长分别为271 nm和291 nm。考虑到含量测定的均衡性,确定测定波长为275 nm。因此,泛酸钙测定波长选择200 nm,氢氯噻嗪和维生素B₆测定波长选择275 nm。

3.4 方法评价

本研究建立的高效液相色谱双波长法,同时测定复方罗布麻片I中3组分的含量,简便易行,可操作性强,重复性好,结果准确,可用于复方罗布麻片I中泛酸钙、氢氯噻嗪和维生素B₆的含量测定。

参考文献

- [1] 许会,汤卫国,黄春玉,等. HPLC法测定复方氨氯地平缓释片氢氯噻嗪片剂溶出度[J]. 药物分析杂志,2015,35(1):46-51.
- [2] 王建平,汪明志. HPLC测定珍菊降压片中氢氯噻嗪不确定度分析[J]. 中国执业药师,2016,13(8):27-31.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:556.
- [4] 杨小林,邱栋樑,尚庆霞,等. HPLC梯度洗脱法测定硝苯地平氨氯噻嗪片中两组分的含量[J]. 海峡药学,2015,27(8):57-58.
- [5] 李浩贤,林华庆,李俊健,等. HPLC-加校正因子的主成分自身对照法同时测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种有关物质含量[J]. 中国药房,2020,31(7):825-830.
- [6] 郭社民,王静. 高效液相色谱法测定复方依美辛胶囊中3种成分含量[J]. 中国药业,2019,28(24):43-45.
- [7] 徐桂连,鹿麟,贺建华. HPLC法同时测定复方三嗪芦丁片中7种成分的含量[J]. 中国药物评价,2019,36(5):344-346.
- [8] 郭伟魁,严倩茹,郭振宇,等. HPLC-DAD法同时测定复方罗布麻片I中4种成分[J]. 中成药,2017,39(8):1625-1628.
- [9] 纪宏,刘晶,王威,等. UPLC法同时测定缬沙坦氢氯噻嗪片中缬沙坦和氢氯噻嗪的含量[J]. 中国药房,2017,28(15):2131-2133.
- [10] 雷雨. HPLC法同时测定复方罗布麻片I中7种活性成分含量[J]. 中国药师,2019,22(2):343-345.
- [11] 范桂强,宋更中,杜艳雪,等. HPLC法同时测定复方三嗪芦丁片中5种成分的含量[J]. 中国药房,2016,27(33):4722-4725.
- [12] 黄雪丽,刘敏,曹蕾,等. 复方利血平片所含成分的测定方法综述[J]. 广州化工,2019,47(18):31-33.
- [13] 王巧荣,李洁,王海波,等. HPLC同时测定复方四嗪利血平片中6种成分的含量及含量均匀度[J]. 华西药学杂志,2019,34(3):196-199.

(收稿日期:2020-08-18;修回日期:2020-12-01)