

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)12-0075-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2024.12.017



超临界流体色谱法测定吲达帕胺及其对映异构体含量

林丽琴¹, 汪霞¹, 杨直¹, 高丽琼¹, 彭彦¹, 石云峰^{2△}

(1. 浙江省杭州市食品药品检验科学研究院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052)

摘要:目的 建立有效分离吲达帕胺对映异构体并测定其含量的超临界流体色谱法。方法 色谱柱为 Daicel IB N-5 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为二氧化碳-0.1% 二乙醇胺甲醇溶液 (70:30, V/V), 背压为 150 bar, 流速为 3.0 mL/min, 检测波长为 243 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 5 μL。结果 吲达帕胺及其对映异构体分离度良好, 5 min 内均已出峰完全。两者质量浓度均在 2.48~37.10 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r=0.9999, n=6$); 检测限均为 0.012 μg/mL, 定量限均为 0.05 μg/mL; 精密度、稳定性试验结果的 RSD 均小于 1.0%; 耐用性良好; 平均回收率分别为 100.75% 和 100.90%, RSD 分别为 1.00% 和 0.72% ($n=9$)。结论 建立的超临界流体色谱法结果准确、耐用性较好, 能有效测定吲达帕胺片中吲达帕胺及其对映异构体的含量。

关键词: 吲达帕胺; 超临界流体色谱法; 手性拆分; 对映异构体; 含量测定

Determination of Indapamide and Its Enantiomer by Supercritical Fluid Chromatography

LIN Liqin¹, WANG Xia¹, YANG Zhi¹, GAO Liqiong¹, PENG Yan¹, SHI Yunfeng²

(1. Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou, Zhejiang, China 310022; 2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou, Zhejiang, China 310052)

Abstract: Objective To establish a supercritical fluid chromatography (SFC) method for effectively separating the enantiomer of indapamide and determining its content. **Methods** The chromatographic column was the Daicel IB N-5 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was carbon dioxide-0.1% diethanolamine methanol solution (70:30, V/V), the back pressure was 150 bar, the flow rate was 3.0 mL/min, the detection wavelength was 243 nm, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. **Results** Indapamide and its enantiomer were separated successfully in 5 min with a good resolution. The linear ranges of the two components were 2.48-37.10 μg/mL ($r=0.9999, n=6$). The limits of detection for both were 0.012 μg/mL, and the limits of quantification for both were 0.05 μg/mL. The RSDs of precision and stability tests were lower than 1.0%. The durability was good. The average recovery rates of indapamide and its enantiomer were 100.75% and 100.90%, with RSDs of 1.00% and 0.72% respectively ($n=9$). **Conclusion** The established SFC method is accurate and durable, which can effectively determine the contents of indapamide and its enantiomer in Indapamide Tablets.

Key words: indapamide; supercritical fluid chromatography; chiral separation; enantiomer; content determination

吲达帕胺(IND)为噻嗪类利尿药/降压药,可抑制远端肾小管皮质电解质与水的再吸收^[1-3]。其分子结构中含1个手性中心,存在1对光学异构体,目前临床使用的是其消旋体^[4]。现有研究对吲达帕胺及其对映异构体的药理学报道较少,有文献报道大鼠体内两者的药物效应动力学差异明显^[5]。超临界流体色谱(SFC)以超临界流体为流动相,因该流体具有较强的溶解能力及良好的传质能力,可利用其溶剂化能力分离化合物^[6-7]。SFC兼具气相色谱和液相色谱的特点,比普通液相能获得更快、更好的分离效果,用于中药成分和手性药物分析优势较大^[8-12]。目前已有报道采用高效液相色谱法和毛细管电泳法分离吲达帕胺对映异构体^[4,13-14],但分离时间较长且峰形欠佳,而采用SFC法对吲达帕胺进行快速手性拆分的方法尚无报道。本研究中拟采用SFC法结合手

性固定相,对吲达帕胺及其对映异构体进行拆分,并测定吲达帕胺片中两者的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC系统(美国Agilent公司);XS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);KQ600DV型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

吲达帕胺片(规格为每片2.5 mg, A企业,批号分别为20190802, 20190803, 20191102; B企业,批号分别为20191201, 20190802, 20191206; C企业,批号分别为1901021, 1903060, 1902021)及其辅料;吲达帕胺对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100257-)

第一作者:林丽琴,女,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析及药品质量控制,(电子信箱)linliqin@aliyun.com。

△通信作者:石云峰,男,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析及药品质量控制,(电子信箱)43544702@qq.com。

201204, 含量 97.7%); 二氧化碳(新世纪混合气体有限公司, 纯度 99.99%); 甲醇为色谱纯, 乙二醇胺为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Daicel IB N - 5 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 二氧化碳 - 0.1% 乙二醇胺甲醇溶液 (70:30, V/V); 背压: 150 bar; 流速: 3.0 mL/min; 检测波长: 243 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取吡达帕胺对照品 50.64 mg, 精密称定, 置 200 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得。

供试品溶液: 取样品 20 片, 研细, 取细粉适量, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇适量, 超声(功率 250 W、频率 40 kHz, 下同)处理 30 min 使溶解, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

空白辅料溶液: 按吡达帕胺片处方配比混合辅料, 称取 1 片样品的量, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇超声处理 30 min, 冷却至室温, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验与专属性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 吡达帕胺及其对映异构体的分离度为 2.6, 基线分离良好; 空白辅料溶液色谱图中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰, 表明专属性良好。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取 2.2 项下对照品溶液适量, 用甲醇稀释成吡达帕胺质量浓度分别为 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 75.0 μg/mL 的系列对照品溶液。各量取 5 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以吡达帕胺及其对映异构体质量浓度 (X , μg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得吡达帕胺

及其对映异构体回归方程分别为 $Y_1 = 4.5448 X_1 - 0.3919$ ($r = 0.9999, n = 6$)、 $Y_2 = 4.5576 X_2 - 0.6752$ ($r = 0.9999, n = 6$)。结果表明, 吡达帕胺及其对映异构体质量浓度均在 2.48 ~ 37.10 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察: 精密量取 2.2 项下对照品溶液适量, 倍比稀释, 并按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比 (S/N) 3:1 和 10:1 时的待测成分质量浓度分别记作检测限、定量限。结果两者的检测限均为 0.012 μg/mL, 定量限均为 0.05 μg/mL。

精密度试验: 取 2.2 项下对照品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果吡达帕胺及其对映异构体峰面积的 RSD 分别为 0.70% 和 0.41% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

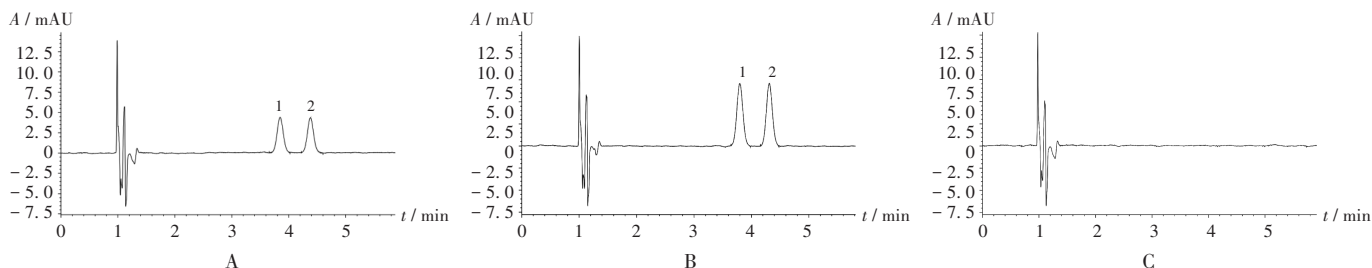
稳定性试验: 取 2.2 项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果吡达帕胺及其对映异构体峰面积的 RSD 分别为 0.90% 和 0.71% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温放置 12 h 内基本稳定。

耐用性考察: 取样品适量, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再将 2.1 项下色谱条件分别改变流速 (± 0.2 mL/min)、柱温 (± 5 °C)、背压 (± 5 bar)、流动相比例 ($\pm 5\%$) 后进样测定, 记录峰面积, 并计算样品含量。结果各色谱条件发生一定程度变化时, 本方法能满足试验要求, 耐用性良好。

回收试验: 分别取已知含量的对照品溶液 8, 10, 12 mL, 各 3 份, 加入处方量的空白辅料溶液, 制成供试品溶液。按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算回收率, 结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 家企业的样品各适量, 分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 平行测定 3 次, 记录峰面积, 并计算样品含量, 结果见表 2。



1. 吡达帕胺 2. 吡达帕胺对映异构体
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白辅料溶液

图 1 超临界流体色谱图

1. Indapamide 2. Enantiomer of indapamide

A. Reference solution B. Test solution C. Blank excipient solution

Fig. 1 SFC chromatograms

表1 回收试验结果 ($n = 9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 9$)

取样量 (mL)	吲达帕胺				吲达帕胺对映异构体			
	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	RSD (%)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	RSD (%)
8	1.015	102.58			1.005	100.57		
8	1.002	101.26			1.003	101.36		
8	0.988	99.85			1.005	101.57		
10	1.255	101.46			1.252	101.22		
10	1.252	101.22	100.75	1.00	1.235	99.85	100.90	0.72
10	1.246	100.74			1.235	99.85		
12	1.473	99.24			1.501	101.13		
12	1.487	100.18			1.505	101.40		
12	1.487	100.18			1.487	100.18		

表2 样品含量测定结果 ($\%, n = 3$)

Tab. 2 Results of content determination of indapamide and its enantiomer in samples ($\%, n = 3$)

批号	吲达帕胺 对映异构体		批号	吲达帕胺 对映异构体		批号	吲达帕胺 对映异构体	
	吲达帕胺	吲达帕胺 对映异构体		吲达帕胺	吲达帕胺 对映异构体		吲达帕胺	吲达帕胺 对映异构体
20190802	51.55	51.56	20191201	49.58	50.07	1901021	47.28	47.03
20190803	50.77	51.22	20190802	50.51	50.37	1903060	47.50	47.72
20191102	51.84	51.68	20191206	49.73	49.67	1902021	47.33	46.54

3 讨论

3.1 色谱柱选择

预试验中选取手性色谱柱 Chiral - V 柱 (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), Daicel AGP 柱 (150 mm × 4.0 mm, 5 μm), Daicel IB N - 5 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 进行考察。结果显示, 在 Chiral - V 柱和 Daicel AGP 柱上目标物质在 5 min 内出峰, 但吲达帕胺对映异构体间仅出现 M 头峰或完全重叠, 无法有效分离, 在 Daicel IB N - 5 柱上目标物质出峰时间较短且吲达帕胺对映异构体间能完全分离。分析后认为, Chiral - V 柱共价键含有大环抗生素的球形硅胶, Daicel AGP 柱共价键含有糖蛋白的球形硅胶, 根据其固定相构型和固定相所引起的立体选择性, 主要解决极性化合物的对映异构体分离。Daicel IB N - 5 柱是共价键合了纤维素 - 三(3,5 - 二甲基苯基氨基甲酸酯)的球形硅胶, 苯基氨基甲酸酯基团环绕主链形成了许多手性空穴, 吲达帕胺结构中氨基与固定相氨基甲酸酯残基上的羰基发生氢键作用, 苯环与固定相有 $\pi - \pi$ 键作用, 根据立体选择性差异的因素, 能较好地分离吲达帕胺对映异构体。

3.2 流动相优化

CO₂ 临界温度 31 °C, 临界压力 7.29 mPa, 对温度、压力有较宽的选择范围, 是较易获得的超临界流体之一, 且对各类有机化合物溶解性较好。在 CO₂ 中添加改性剂可改善分离的选择性, 甲醇是最常用的改性剂, 考

虑到 2020 年版《中国药典(二部)》^[15] 中测定吲达帕胺片含量时以乙醇为溶剂, 故预试验中尝试分别以 30% 乙醇和甲醇为改性剂。在其他色谱条件相同的情况下, 以甲醇为改性剂时, 可获得良好的分离度和更短的分析时间, 选择甲醇为改性剂进一步优化比例与添加剂。尝试在改性剂中加入微量添加剂二乙醇胺, 可在不影响分析效果的前提下缩短保留时间。考察了 20%, 30%, 40% 甲醇, 结果 20% 甲醇出峰时间在 10 min 左右, 峰形较宽; 30% 甲醇出峰时间在 4 min 左右, 分离度和峰形俱佳; 40% 甲醇出峰时间在 2 min 左右, 峰形较窄, 但分离度有所损失。综合考虑保留时间、分离度, 选择二氧化碳 - 0.1% 二乙醇胺甲醇溶液 (70:30, V/V) 作为流动相。

3.3 柱温和背压考察

预试验中考察了不同柱温对分离效果的影响 (30, 40, 50 °C), 结果表明, 柱温越高出峰越快, 同时峰宽变窄。但该色谱柱最佳使用温度为 0 ~ 40 °C, 故选用 40 °C 作为试验温度。同时考察了背压 (120, 150, 180 bar) 对分离效果的影响, 结果均无明显影响, 仅对保留时间有影响, 故最后确定用保留时间最短的 150 bar 的压力作为方法参数。

3.4 样品前处理方法优化

吲达帕胺同时可溶于乙醇和甲醇, 2020 年版《中国药典(二部)》^[15] 中以乙醇为吲达帕胺片含量测定的处理溶剂, 考虑到流动相中所含改性剂为 30% 甲醇, 为减少溶剂效应, 采用甲醇替代乙醇作为提取溶剂, 结果两者提取效率相当。同时考察了样品溶液超声不同时间 (15, 30, 60 min) 对提取效率的影响, 结果表明, 超声 15 min 时提取效率略低, 30 min 和 60 min 时提取效率相当, 故选择甲醇超声处理 30 min 为样品的前处理方式。

3.5 方法评价

本研究中采用 SFC 法对不同企业的 3 批吲达帕胺片进行含量测定, 结果表明, 吲达帕胺片产品中的吲达帕胺均为消旋体, 2 个对映异构体含量构成均为 1:1, 比例稳定。建立的方法可在 5 min 内完成吲达帕胺对映异构体间的完全拆分与测定, 相比高效液相色谱法, 此方法具有分离效率高, 分离时间短, 有机试剂用量少, 样品配制与操作简便等优点, 实现了 SFC 在分析技术领域绿色环保的理念, 可为吲达帕胺质量控制和研究提供更快更有效的选择。但由于目前吲达帕胺仅能采购到消旋体的对照品, 故本研究中以对照品中 2 个对映异构体的占比为 1:1 计算含量, 下一步拟对 2 个异构体进行分离制备, 并分别对其药理学活性进行检测, 为本品的药品再评价提供数据支持。

参考文献

- [1] 李 强, 沈丽霞, 李明春, 等. 抗高血压药物噻嗪类利尿剂应用新进展[J]. 中国药业, 2021, 30(19): 1 - 4.