

对 3 个产地穿山龙药材中残留的 23 种有机氯、有机磷和拟除虫菊酯类农药进行研究。与操作复杂且有有机溶剂用量大的传统方法相比,分散固相萃取法将提取和净化一步完成,简化了样品前处理的步骤,减少了有机试剂的消耗,并增加了农药检测品种,符合农药残留检测分析技术的发展方向和趋势。

REFERENCES

- [1] ANASTASSADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, *et al*. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce[J]. *J AOAC Int* 2003; 86(2): 412-431.
- [2] LEHOTAY S J, DE KOK A, HIEMSTRA M, *et al*. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229

pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection[J]. *J AOAC Int* 2005; 88(2): 595-614.

- [3] LI C F, SHEN W J, JIANG Y, *et al*. Determination of 20 kinds of pesticide residues in soybeans and corn using gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry coupled with offline dispersive solid phase extraction[J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2009, 27(2): 176-180.
- [4] LI L, LI W, GE J *et al*. Use of graphitic carbon black and primary secondary amine for determination of 17 organophosphorus pesticide residues in spinach[J]. *J Sep Sci* (分离科学杂志), 2008, 31(20): 3588-3594.
- [5] ALBERO B, SANCHEZ-BRUNETE C, TADEO J L. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2005; 66(4): 917-924.

(收稿日期: 2010-08-26)

HPLC 同时测定复方利血平氨苯蝶啶片中 3 种活性成分的含量

金鹏飞, 邝咏梅, 邹定, 胡欣, 姜文清, 吴学军 (卫生部北京医院药学部, 北京 100730)

摘要: 目的 应用高效液相色谱 (HPLC) 技术, 建立复方利血平氨苯蝶啶片中硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶含量的同时测定方法。方法 采用 Alltima C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) 和含 0.04% 庚烷磺酸钠的 50 mmol/L 磷酸二氢铵溶液磷酸调至 pH 3.0 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~15 min A:B 为 12:88, 15~20 min A:B 由 12:88 转变为 32:68, 20~30 min A:B 为 32:68, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。结果 在本方法中, 硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的线性关系良好, 线性相关系数 (*r*) 都大于 0.999 2, 专属性强, 3 种成分和药品中其他成分以及强制降解产物之间都有良好的分离度; 精密度和稳定性良好, 相对标准偏差 (RSD) 都小于 2.0%; 加样回收率良好, 百分回收率在 99.90% 和 102.8% 之间。结论 该方法准确、简单、快速, 可作为复方利血平氨苯蝶啶片中硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 复方利血平氨苯蝶啶片; 硫酸双肼屈嗪; 氢氯噻嗪; 氨苯蝶啶

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2011)02-0152-04

Simultaneous Determination of Three Active Ingredients in Compound Hypotensive Tablets by HPLC

JIN Peng-fei, KUANG Yong-mei, ZOU Ding, HU Xin, JIANG Wen-qing, WU Xue-jun (Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of dihydralazine sulfate, hydrochlorothiazide and trimterene in Compound Hypotensive Tablets. **METHODS** An Alltima C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for the separation with acetonitrile (A) and 50mM ammonium dihydrogen phosphate containing 0.04% heptane sulfonic acid sodium salt adjusted pH to 3.0 with H₃PO₄ (B) as the mobile phase at the flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. A gradient elution procedure was set as follows: 0~15 min A:B 12:88, 15~20 min A:B from 12:88 to 32:68, 20~30 min A:B 32:68. The detection wavelength was 280 nm. **RESULTS** The method showed good linearity for dihydralazine sulfate, hydrochlorothiazide and trimterene with all correlation coefficients (*r*) above 0.999 2. The specificity study showed satisfactory

基金项目: 中央保健科研课题专项资金 (B2009B032); 卫生行业科研专项子课题 (200902009-03)

作者简介: 金鹏飞, 男, 博士 研究方向: 药物分析 Tel: (010) 85133621 E-mail: j790101@sohu.com

resolutions among d hydrazine sulfate, hydrochlorothiazide, triamterene, other ingredients and forced degradation products. The precisions and stability were satisfactory with all relative standard deviations (RSD) below 2.0%. The spiked recovery for three compounds ranged from 99.90% to 102.8%. **CONCLUSION** This method is an accurate, fast and simple method for the simultaneous determination of d hydrazine sulfate, hydrochlorothiazide and triamterene in Compound H hypotensive Tablets.

KEY WORDS HPLC; compound hypotensive tablets; d hydrazine sulfate; hydrochlorothiazide; triamterene

复方利血平氨苯蝶啶片是由利血平、氨苯蝶啶、氢氯噻嗪和硫酸双肼屈嗪组成的复方制剂,临床上主要应用于轻、中度高血压的治疗。现行国家药品试行标准 W S-10001-(HD-1285)-2002和文献^[1-2]采用 HPLC 技术对复方利血平氨苯蝶啶片中的硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶进行含量测定,但所用色谱柱为氰基柱,且 3 种成分的提取方法各不相同,比较繁琐。本文建立的方法,只需一次溶样,并应用常规的十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(C₁₈)即可实现硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的同时测定,具有简便、快捷、易推广的优点。

1 仪器与试剂

Waters 2695 液相色谱分离系统(包括四元梯度泵、自动进样器和柱温箱);Waters 2696 二极管阵列检测器;Empower 色谱工作站;Mettler XP-205 电子天平;Millipore 超纯水处理系统。KQ-800KDE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);101A-2 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器总厂);SPX-250 LC 微电脑人工气候箱(上海博迅实业有限公司)。硫酸双肼屈嗪对照品(批号:100514-200301)、氢氯噻嗪对照品(批号:100309-200702)、氨苯蝶啶对照品(批号:100429-200401)均购自中国药品生物制品检定所;庚烷磺酸钠(Across 公司);乙腈(色谱纯);磷酸二氢铵、磷酸、氨水、30% 过氧化氢均为分析纯;实验用水为超纯水。复方利血平氨苯蝶啶片(批号:091109D, 090809C, 090614B)由北京双鹤药业股份有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以乙腈(A)和含 0.04% 庚烷磺酸钠的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液磷酸调至 pH 3.0(B)为流动相,梯度洗脱:0~15 min A:B 为 12:88, 15~20 min A:B 由 12:88 转变为 32:68, 20~30 min A:B 为 32:68, 流速:0.5 mL·min⁻¹;进样量:10 μL;检测波长:280 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶对照品适量(各约 100 mg),置于 200 mL 量瓶中,加入 50% 乙腈溶液适量,超声使溶解,并用 50% 乙腈溶液定容至刻度,摇匀,即为混合储备液。精密量取混合储备液适量,分别用体积分数 50% 乙腈溶液稀释成质量浓度约为 0.075、0.100、0.125、0.150、0.175 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。0.125 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液作为标准工作液,用于方法的系统适应性研究。进样前,用 0.22 μm 孔径尼龙滤膜滤过。

2.3 供试品溶液的制备

取复方利血平氨苯蝶啶片 20 片,精密称定,研细,精密称取粉末适量(约相当于 1 片量),置 100 mL 量瓶中,加入 50% 乙腈溶液适量,超声 20 min, 50% 乙腈溶液定容至刻度,摇匀,即得。进样前,用 0.22 μm 孔径尼龙滤膜滤过。

2.4 阴性对照溶液的制备

根据复方利血平氨苯蝶啶片的制剂配方,配制不含硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的阴性对照粉末。称取阴性对照粉末适量(约相当于 1 片制剂量),按照“2.3”项下规定制备阴性对照溶液。阴性对照溶液除了不含硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶外,其他成分的浓度都和供试品溶液基本一致。阴性对照溶液用于本方法的专属性和回收率实验。

2.5 专属性试验

2.5.1 基质干扰试验 分别对阴性对照溶液、混合对照品溶液和供试品溶液进样分析,考察样品中其他成分和辅料对利血平色谱峰的干扰。阴性对照溶液、混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图(图 1)结果显示:样品中其他成分和辅料不干扰硫酸双肼屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的测定。

2.5.2 强制降解试验 为进一步考察方法的专属性,本文对阴性对照粉末、硫酸双肼屈嗪对照品、氢氯噻嗪对照品和氨苯蝶啶对照品,分别在加热、光照、氧化、酸化和碱化等条件下进行了强制降解实验,以考察降解产物对分析的干扰。为考察热降解产物,将阴性对照粉末约 110 mg(1 片量)、氨苯蝶

啉对照品约 12.5 mg 氢氯噻嗪对照品约 12.5 mg 和硫酸双胍屈嗪对照品约 12.5 mg 分别置于 100 mL 量瓶中, 80 ℃烘箱加热 4 h 冷却至室温后, 按照“2.3”项下规定, 过滤, 进样分析。光降解产物的考察则是将上述样品置于微电脑人工气候箱中, 10 000 lx 光照强度下照射 4 h 后, 制备供试品溶液; 氧化产物的考察, 上述样品中同时加入 30% 的过氧化氢溶液 1 mL, 暗处放置 24 h 后, 制备供试品溶液; 酸降解产物的考察, 分别加入 20% 的磷酸溶液 1 mL, 暗处放置 24 h 后, 用浓氨水中和成中性, 制备供试品溶液; 碱降解产物的考察, 上述样品中分别加入浓氨水 1 mL, 暗处放置 24 h 后, 用 20% 的磷酸溶液中和成中性, 制备供试品溶液。强制降解试验表明: 在该色谱条件下, 硫酸双胍屈嗪在酸化和碱化条件下都能检测到降解产物(图 2A, 2B); 氨苯蝶啶在氧化条件下能检测到降解产物(图 2C); 阴性对照粉末和氢氯噻嗪在各种条件下均未检测到降解产物。硫酸双胍屈嗪和氨苯蝶啶的降解产物在 22.7~23.8

min 的峰位都有色谱峰, 但保留时间刚好介于氢氯噻嗪和氨苯蝶啶色谱峰之间, 不干扰两者的测定。

2.6 系统适应性, 最低检测限和线性关系

标准工作液连续进样 5 次, 考察硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶色谱峰的理论塔板数和对称因子。将对照品溶液逐级稀释后, 以信噪比 (S/N) 约为 3.0 时的浓度为各成分的最低检测限。以各成分的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 在相当于供试品溶液浓度 60% ~ 140% 的范围内进行了线性考察。结果见表 1。

2.7 精密度和稳定性

对批号为 091109D 的样品制备 6 份供试品溶液, 测得各成分含量的 RSD 作为方法重复性。对 1 份供试品溶液连续进样 6 次, 各成分色谱峰峰面积的 RSD 作为仪器精密度的。对批号为 091109D 的样品连续测定 6 d 6 d 测得各成分含量的 RSD 作为方法稳定性的。结果表明, 所有 RSD 都小于 2%, 表明精密度和稳定性良好。

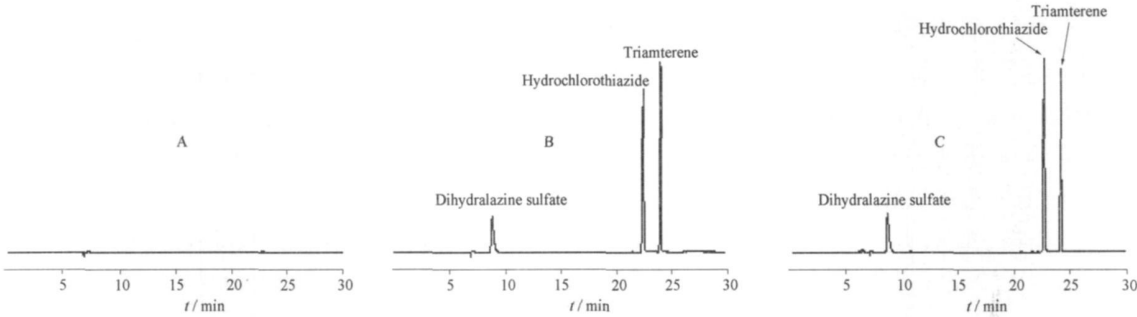


图 1 阴性对照溶液(A)、混合对照品溶液(B)和供试品溶液(C)的色谱图(检测波长:280 nm)

Fig. 1 Chromatograms for placebo (A), combined standards (B), and the analytical sample (C), detected(280 nm)

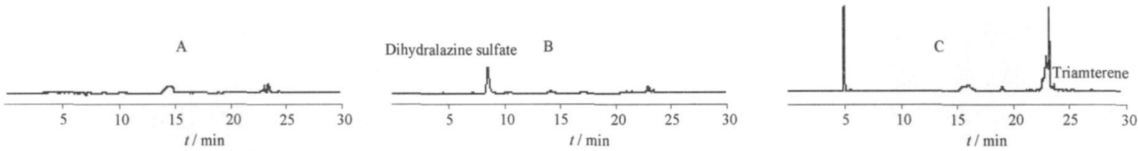


图 2 硫酸双胍屈嗪强制降解产物的色谱图

A - 酸降解; B - 碱降解; C - 氨苯蝶啶氧化

Fig. 2 Chromatograms for degraded samples of dihydralazine sulfate

A - acid degradations; B - alkali degradations; C - oxidation degradations of triamterene

表 1 系统适应性、最低检测限和线性考察结果. $n = 5 \bar{x} \pm s$

Tab 1 Results of system suitability limits of detection and linearity. $n = 5 \bar{x} \pm s$

Parameters	Theoretical plate	Asymmetry factor	Linear equation	r	LOD/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
Dihydralazine sulfate	8 674 $\pm$ 31	1.415 $\pm$ 0.075	$Y = 15 868.64X - 160.742$	0.9994	0.156
Hydrochlorothiazide	128 943 $\pm$ 642	1.042 $\pm$ 0.002	$Y = 45 935.609X + 162.076$	0.9992	0.074
Triamterene	374 761 $\pm$ 364	0.963 $\pm$ 0.004	$Y = 32 849.360X + 71.230$	0.9993	0.037

2.8 加样回收率实验

在阴性对照粉末中分别加入适量的混合储备液适量,按照“2.3”项下规定制备供试品溶液,在相当于供试品溶液 80%、100% 和 120% 的浓度水平下,分别考察加样回收率。每个浓度制备 3 份,峰面积平均值和对照品溶液峰面积平均值的比值作为回收率。结果表明,硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的回收率都在 99.90% 和 102.8% 之间。

2.9 实际样品测定

应用本文建立的方法对 3 个批次的复方利血平氨苯蝶啶片进行了测定,每批样品测定 3 次,结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取方法的优化

硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的化学性质相差很大,溶解性能各不相同。硫酸双胍屈嗪易溶于水,但难溶于有机溶剂;氢氯噻嗪在有机溶剂中溶解度好,但难溶于水;氨苯蝶啶则在各种有机溶剂和水中的溶解度都不佳,只在冰醋酸中的溶解度最好。这也是国家药品试行标准 WS-10001-(HD-1285)-2002 对 3 种成分采取不同的提取方法的原因。本文对提取方法进行优化时发现:氨苯蝶啶虽然在乙腈和水中的溶解度都不好,但在 50% 乙腈溶液中溶解度显著提高,而硫酸双胍屈嗪和氢氯噻嗪在此溶剂中亦有一定的溶解度。因此确定 50% 乙腈溶液作为提取液。在超声时间的优化上,发现超声 20 min 各成分都能得到完全提取,因而确定超声时间为 20 min。在溶液进样前的处理方式上,文献认为^[2]:过滤会导致硫酸双胍屈嗪和氨苯蝶啶的吸附,因而需采用离心方法对溶液进行处理。本文应用津腾 0.22 μm 孔径尼龙滤膜对进样前溶液进行过滤时,并未发现滤过液和离心液的峰面积有显著差别,所以吸附程度很可能因所用的滤膜而异。

表 2 实际样品的测定结果 . $n = 3 \bar{x} \pm s$

Tab 2 Results of sample analysis $n = 3 \bar{x} \pm s$

Batch	Dihydralazine sulfate	Hydrochlorothiazide	Triamterene
	% of label claim	% of label claim	% of label claim
090614B	104.4 ± 0.4	102.1 ± 0.3	98.49 ± 0.29
090809C	104.8 ± 0.8	99.06 ± 0.89	94.69 ± 0.80
091109D	105.0 ± 1.6	102.5 ± 1.5	94.64 ± 1.30

3.2 色谱条件的优化

硫酸双胍屈嗪极性很大,在 C₁₈ 色谱柱上难以保留;氨苯蝶啶碱性较强,色谱峰峰形易拖尾;氢氯噻嗪的分析相对容易。在流动相筛选时,磷酸二氢铵-乙腈系统有较好的分离效能,将 pH 值调到 3.0 后,3 种成分的峰形和分离度都良好。但专属性试验发现:在该色谱条件下,硫酸双胍屈嗪和氨苯蝶啶的氧化降解产物之间、氢氯噻嗪及氨苯蝶啶和硫酸双胍屈嗪的酸碱降解产物之间无法达到基线分离。缓冲盐中加入 0.04% 的离子对试剂庚烷磺酸钠后,各成分保留时间都变长,分离度得到改善。此外,由于硫酸双胍屈嗪和另两种成分的极性差异,保留时间相差很大,为缩短分析时间,本文采用梯度洗脱方式。而系统适应性试验表明:梯度洗脱后,氢氯噻嗪及氨苯蝶啶色谱峰的对称因子和理论塔板数都得到了极大的改善,对称因子都在 0.95~1.05 之间,理论塔板数更是达到 1×10^5 以上。

3.3 检测波长的选择

检测波长的选择是以各成分在流动相中的紫外吸收图谱为依据的。硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶紫外图谱的最大吸收分别为 308、271 和 360 nm,但考虑到 3 种成分在 280 nm 处都有较强吸收,因而,选择 280 nm 作为检测波长。

3.4 方法学验证

本文的方法学验证严格参照国际通行的 ICH 方法学验证原则进行,验证内容包括系统适应性、线性、最低检测限、专属性、精密度、稳定性、准确度等。其中,专属性除考察了辅料等基质干扰外,还对强制降解产物的干扰进行了考察。

4 结论

本方法和国标方法相比,具有简便,快捷,易推广的优点,可替代国标方法,应用于复方利血平氨苯蝶啶片中硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪和氨苯蝶啶的测定。

REFERENCES

[1] WS-10001-(HD-1285)-2002. Drug Standard of China by SFDA (国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准第十三册) [S]. 2002. 256-257.
[2] CHE B Q. Determination of five components in compound hypertensive tablet by HPLC [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39 (8): 618-620.

(收稿日期: 2010-09-20)