

RP-HPLC-UV 波长切换法同时测定复方硝酸异山梨酯胶囊中5种成分的含量

赵建颖*(洛阳市食品药品检验所,河南 洛阳 471023)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)44-4210-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.44.26

摘要 目的:建立同时测定复方硝酸异山梨酯胶囊中氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯和尼群地平含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱-紫外波长切换法。色谱柱为 YMC-Pack Pro C₁₈ 柱,流动相为乙腈-水(用磷酸调节 pH 至 2.5,进行梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,柱温为 40 ℃,进样量为 5 μl,检测波长 0~5.6 min 为 271 nm, >5.6~8.0 min 为 215 nm, >8.0~12.0 min 为 276 nm, >12.0~17.0 min 为 303 nm, >17.0~23.0 min 为 230 nm, >23.0~35.0 min 为 235 nm。结果:氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平检测质量浓度分别在 7.97~510.38、16.09~1 030.02、16.42~1 050.60、5.10~326.20、8.48~542.60 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 7$ 、 $0.999\ 7$ 、 $0.999\ 5$ 、 $0.999\ 6$ 、 $0.999\ 5$);精密度、稳定性、重复性试验的 RSD≤1.54%;平均加样回收率分别为 99.60%、99.30%、99.61%、98.88%、99.89%, RSD 分别为 0.77%、0.61%、0.41%、0.74%、0.88%($n=6$)。结论:该方法简便、快速、准确、重复性好,可用于复方硝酸异山梨酯胶囊的质量控制。

关键词 复方硝酸异山梨酯胶囊;氢氯噻嗪;卡托普利;阿司匹林;硝酸异山梨酯;尼群地平;反相高效液相色谱-紫外波长切换法

Simultaneous Determination of 5 Components in Compound Isosorbide Dinitrate Capsules by RP-HPLC-UV Wavelength Switching Method

ZHAO Jian-ying(Luoyang Institute for Food and Drug Control, Henan Luoyang 471023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, captopril, aspirin, isosorbide dinitrate and nitrendipine in Compound isosorbide dinitrate capsules. METHODS: RP-HPLC-UV wavelength switching method was adopted. The separation was carried out on a YMC-Pack Pro-C₁₈ column with acetonitrile (mobile phase A)-water (adjusted pH to 2.5 with phosphoric acid, mobile phase B) in a gradient elution mode at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was set at 40 ℃ and injection volume was 5 μL. At 0-5.6 min, the detection wavelength was 271 nm. At 5.6-8.0 min, the detection wavelength was 215 nm. At 8.0-12.0 min, the detection wavelength was 276 nm. At 12.0-17.0 min, the detection wavelength was 303 nm. At 17.0-23.0 min, the detection wavelength was 230 nm. At 23.0-35.0 min, the detection wavelength was 235 nm. RESULTS: The linear ranges of hydrochlorothiazide, captopril, aspirin, isosorbide dinitrate and nitrendipine were 7.97-510.38 μg/ml ($r=0.999\ 7$), 16.09-1 030.02 μg/ml ($r=0.999\ 7$), 16.42-1 050.60 μg/ml ($r=0.999\ 5$), 5.10-326.20 μg/ml ($r=0.999\ 6$) and 8.48-542.60 μg/ml ($r=0.999\ 5$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.54%. The average recovery rates of them were 101.01% (RSD=0.98%, $n=6$), 101.38% (RSD=1.01%, $n=6$), 101.39% (RSD=0.57%, $n=6$), 102.88% (RSD=1.11%, $n=6$), 101.83% (RSD=0.98%, $n=6$). CONCLUSIONS: This method is simple, rapid, accurate and reproducible, which is suitable for the quality control of Compound isosorbide dinitrate capsules.

KEY WORDS Compound isosorbide dinitrate capsules; Hydrochlorothiazide; Captopril; Aspirin; Isosorbide dinitrate; Nitrendipine; RP-HPLC-UV wavelength switching method

复方硝酸异山梨酯胶囊是河南科技大学第二附属医院自制的医院制剂(批准文号:河南省食品药品监督管理局医疗机构制剂注册批件2004H00551),由硝酸异山梨酯、卡托普利、尼群地平、氢氯噻嗪、阿司匹林5种成分组成。本方将3种作用机制不同的抗高血压药和血管扩张药硝酸异山梨酯及抗血栓药阿司匹林联合应用,临床用于高血压合并心脏病的治疗,效果良好。方中多种药物的联合应用能减少各药使用剂量和保持稳定的治疗效果,并可减少药品不良反应。该制剂原质量标准中仅有常规检查、鉴别项目,未对各成分进行含量控制,从而不能有效地控制制剂质量。相关文献报道仅对方中硝酸异山梨酯进行了质量控制,不能完全反映制剂的内在质量^[1]。笔者在原质量标准基础上进一步进行研究,采用反相高效液相色谱-紫外波长(RP-HPLC-UV 波长)切换法同时测定复

方硝酸异山梨酯胶囊中硝酸异山梨酯、卡托普利、氢氯噻嗪、阿司匹林、尼群地平5种成分的含量。

1 材料

1260 型高效液相色谱(HPLC)仪,含 G1311C 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314F 紫外检测器、Agilent ChemStation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);92SM-202A-DR 型电子分析天平(瑞士 Precisa 公司);UV-2401PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

硝酸异山梨酯、卡托普利、氢氯噻嗪、尼群地平、阿司匹林、水杨酸对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号:100250-201004、100318-200602、100309-200703、100585-200501、100113-200302、100106-200303,质量分数:100.0%、99.5%、99.8%、100.0%、100.0%、100.0%);复方硝酸异山梨酯胶囊(河南科技大学第二附属医院制剂室提供,批号:20110518、20110713、20111213);乙腈为色谱纯,磷酸为分析

* 主管药师。研究方向:药品质量标准。电话:0379-63935767。
E-mail: lyxbl2012@163.com

纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性

色谱柱: YMC-Pack Pro C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(流动相A)-水(流动相B,用磷酸调节pH至2.5),梯度洗脱程序见表1;流速:1.0 ml/min;检测波长:0~5.6 min时检测波长为271 nm, >5.6~8.0 min时检测波长为215 nm, >8.0~12.0 min时检测波长为276 nm, >12.0~17.0 min时检测波长为303 nm, >17.0~23.0 min时检测波长为230 nm, >23.0~35.0 min时检测波长为235 nm;柱温:40.0 ℃;进样量:5 μl。在此色谱条件下,理论板数以卡托普利峰计不低于4 000,各色谱峰的分离度均大于3.7。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process of mobile phase

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	25	75
8	25	75
12	35	65
30	80	20
35	25	75

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 分别精密称取硝酸异山梨酯对照品 16.31 mg、卡托普利对照品 51.76 mg、氢氯噻嗪对照品 25.57 mg、阿司匹林对照品 52.53 mg、尼群地平对照品 27.13 mg,置于同一50 ml量瓶中,用乙腈使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液5 ml,置于50 ml量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品内容物适量(约相当于硝酸异山梨酯3 mg),置于100 ml量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例制备不含硝酸异山梨酯、卡托普利、氢氯噻嗪、阿司匹林、尼群地平的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别取“2.2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图1。由图1可见,在对照品色谱峰相应位置供试品有色谱峰出现,而阴性对照在此处无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量(氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平质量浓度分别为510.38、1 030.02、1 050.60、326.20、542.60 μg/ml),然后采用倍比稀释法制成一系列不同质量浓度的溶液。按照“2.1”项下色谱条件分别取5 μl进样,记录色谱峰面积。以各成分峰面积(y)为纵坐标,检测质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,其回归方程和线性范围详见表2。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液5 μl,注入HPLC仪,连续进样6次,测定各成分的峰面积。结果,氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平的RSD分别为0.83%、0.97%、1.30%、1.53%、1.09%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

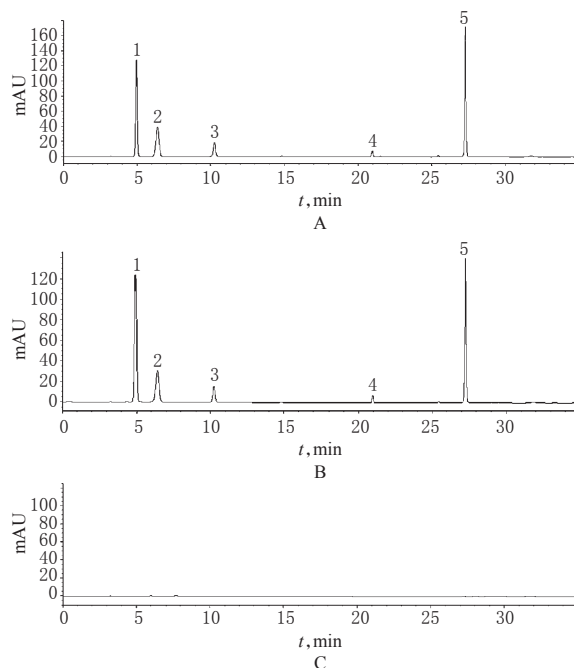


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 氢氯噻嗪; 2. 卡托普利; 3. 阿司匹林; 4. 硝酸异山梨酯; 5. 尼群地平

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. hydrochlorothiazide; 2. captopril; 3. aspirin; 4. isosorbide dinitrate; 5. nitrendipine

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
氢氯噻嗪	$y=0.306 6x-0.207 4$	0.999 7	7.97~510.38
卡托普利	$y=0.091 5x-0.083 6$	0.999 7	16.09~1 030.02
阿司匹林	$y=0.031 5x-0.039 5$	0.999 5	16.42~1 050.60
硝酸异山梨酯	$y=0.026 9x-0.015 1$	0.999 6	5.10~326.20
尼群地平	$y=0.334 7x-0.253 9$	0.999 5	8.48~542.60

取“2.2.3”项下供试品溶液适量,于室温下放置,分别在0、2、6、10、12 h时进样测定各成分的峰面积。结果,氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平的RSD分别为0.86%、1.37%、1.51%、1.01%、1.14%,表明12 h内供试品溶液稳定性良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品(批号:20111213)内容物适量,共6份,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算各成分含量。结果,含氢氯噻嗪、卡托普利、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平的量平均分别为20.17、33.54、35.18、12.25、18.25 mg/g, RSD分别为0.92%、1.23%、1.19%、1.54%、1.06%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知各成分含量的样品(批号:20111213)内容物共6份,每份约0.125g(约相当于硝酸异山梨酯1.5 mg),分别置于100 ml量瓶中,各精密加入“2.2.1”项下对照品贮备液5 ml,加乙腈使溶解并稀释至刻度,摇匀,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并计算加样回收率,结果见表3。

2.9 样品含量测定

表3 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
氢氯噻嗪	2.414	2.557	4.972	100.02	99.60	0.77
	2.422	2.557	4.949	98.84		
	2.444	2.557	4.991	99.62		
	2.407	2.557	4.979	100.58		
	2.393	2.557	4.913	98.57		
	2.374	2.557	4.931	99.99		
卡托普利	4.437	5.176	9.609	99.92	99.30	0.61
	4.451	5.176	9.618	99.83		
	4.491	5.176	9.631	99.30		
	4.424	5.176	9.542	98.88		
	4.397	5.176	9.487	98.34		
	4.364	5.176	9.514	99.51		
阿司匹林	4.654	5.253	9.878	99.44	99.61	0.41
	4.668	5.253	9.865	98.93		
	4.711	5.253	9.942	99.59		
	4.640	5.253	9.897	100.07		
	4.612	5.253	9.859	99.88		
	4.577	5.253	9.818	99.77		
硝酸异山梨酯	1.621	1.631	3.241	99.35	98.88	0.74
	1.626	1.631	3.229	98.31		
	1.640	1.631	3.258	99.19		
	1.616	1.631	3.209	97.68		
	1.606	1.631	3.223	99.14		
	1.594	1.631	3.218	99.59		
尼群地平	2.668	2.713	5.363	99.32	99.89	0.88
	2.677	2.713	5.357	98.80		
	2.701	2.713	5.412	99.94		
	2.660	2.713	5.401	101.20		
	2.644	2.713	5.342	99.44		
	2.624	2.713	5.359	100.81		

取3批硝酸异山梨酯胶囊,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件下进样测定,记录色谱,按外标法以峰面积计算各成分含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Tab 4 Results of content determination of samples (mg/g, n=3)

批号	含量				
	氢氯噻嗪	卡托普利	阿司匹林	硝酸异山梨酯	尼群地平
20110518	20.57	33.71	35.72	12.69	18.85
20110713	20.33	33.28	35.49	12.32	18.34
20111213	20.17	33.54	35.18	12.25	18.25

3 讨论

3.1 流动相的选择

由于方中各成分极性差别大,参考相关文献^[2-10],本试验考察了0.1 mol/L磷酸二氢钠溶液-甲醇-乙腈、甲醇-水(用磷酸调节pH至3.0)、乙腈-水(用磷酸调节pH至2.5)等不同的等度和梯度洗脱流动相系统,最终选用乙腈-水(用磷酸调节pH至2.5)梯度洗脱流动相系统进行分离,在此条件下样品中5种成分分离度良好,且峰形较佳。

3.2 检测波长的选择

取各对照品适量,配制成适宜浓度的乙腈溶液,按紫外-可见分光光度法在190~400 nm波长范围内扫描吸收光谱。结果表明,阿司匹林在276 nm波长处有最大吸收,尼群地平在

235 nm波长处有最大吸收,氢氯噻嗪在271、226 nm波长处有最大吸收,硝酸异山梨酯在230 nm波长处有最大吸收,上述各组分确定检测波长较为容易,而卡托普利只有紫外末端吸收,因此检测波长只能在紫外末端附近确定。考虑到乙腈的截止使用波长及参照《中国药典》^[2],最终确定在215、271、276、230、235 nm波长处分别测定卡托普利、氢氯噻嗪、阿司匹林、硝酸异山梨酯、尼群地平的含量。

3.3 游离水杨酸的含量控制

水杨酸是阿司匹林的降解产物,刺激性大,仅作为抗真菌药和角质溶解药外用,故应控制其含量。笔者用本试验色谱条件对该制剂中水杨酸进行了考察,操作如下:(1)按“3.2”项下方法选择水杨酸的检测波长,结果表明水杨酸在303 nm波长处有最大吸收,故以此波长作为其检测波长。(2)取水杨酸对照品适量,加乙腈超声溶解,制成约含0.03 mg/ml的溶液,精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,再精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液5 ml,用乙腈稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明,水杨酸色谱峰保留时间约为15 min,与其他色谱峰均达到完全分离,且峰形良好,不干扰其他主成分色谱峰。因此,本方法也可作为该制剂中水杨酸的含量控制方法。

3.4 避光操作

处方中尼群地平见光易分解,为保证准确地测定样品含量,试验过程中应避光操作,且最好选用棕色量瓶以保证避光效果。

综上所述,本方法简便、快速、准确、重复性好,可用于复方硝酸异山梨酯胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 王璐.高效液相色谱法测定复方硝酸异山梨酯胶囊中硝酸异山梨酯的含量[J].北方药学,2012,9(2):2.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:578.
- [3] 郗冰冰,郭瑞锋,何建峰,等. HPLC法测定复方卡托普利片中卡托普利和氢氯噻嗪的含量[J].药物分析杂志,2007,27(2):282.
- [4] 张秋荣,查岭,郑东娜,等. HPLC测定复方尼群地平片中尼群地平和氢氯噻嗪的含量[J].中国药学杂志,2007,42(20):1585.
- [5] 胡海廷,陈权,刘建华. HPLC法测定复方卡托普利片中两种成分的含量[J].洛阳师范学院学报,2009,28(5):64.
- [6] 王宜祥,杨汉中,吴韶铭. 复方卡托普利片中卡托普利和氢氯噻嗪的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2003,34(8):404.
- [7] 谢清萍. 中成药中可能违禁添加6种化学降压药物的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2010,41(6):450.
- [8] 姜建国,张西如,高燕霞. 液相色谱-质谱联用法检测中药中非法添加的硝苯地平、尼群地平和尼莫地平[J].中国药房,2010,21(17):1604.
- [9] 郭润勤,赵建颖,杨金燕. 梯度洗脱法同时测定复方卡托普利尼群地平胶囊(II)中3种成分的含量[J].中国医药科学,2013,3(11):99.
- [10] 张涛,严复,赵一玫,等. HPLC用于复方单硝酸异山梨酯-阿司匹林缓释片的质量分析[J].中国药学杂志,2003,38(7):530.

(收稿日期:2013-05-23 修回日期:2013-10-09)