

HPLC法同时测定复方二氯醋酸二异丙胺片两组分含量

林白云^{1,2*}, 余邦良¹, 杨柳^{1#}(1.海南医学院药学院,海口 571101;2.海南凯健制药有限公司,海口 510623)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3138-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.23

摘要 目的:建立同时测定复方二氯醋酸二异丙胺片中两组分(二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Ultimate XB-C₁₈;流动相为磷酸盐缓冲液,流速为1.0 ml/min;检测波长为205 nm;室温分析;配制样品的溶剂为水。结果:二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的检测质量浓度线性范围分别为1.20~2.80($r=0.999\ 5$)、1.17~2.73 mg/ml($r=0.999\ 6$);平均回收率分别为100.2%(RSD=0.36%)、100.3%(RSD=0.28%)。结论:建立的方法简便、准确、灵敏度高,可同时测定复方二氯醋酸二异丙胺片中两组分的含量。

关键词 复方二氯醋酸二异丙胺片;葡萄糖酸钙;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Two Components in Compound Diisopropylamine Dichloroacetate Tablets by HPLC

LIN Bai-yun^{1,2}, YU Bang-liang¹, YANG Liu¹(1.School of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou 571101, China;2.Hainan Kaijian Pharmaceutical Co., Ltd., Haikou 510623, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of the contents of diisopropylamine dichloroacetate and calcium gluconate in Compound diisopropylamine dichloroacetate tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Ultimate XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of phosphate buffer at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 205 nm, and column temperature was room temperature. Sample was prepared with water. RESULTS: The linear range of diisopropylamine dichloroacetate and calcium gluconate were 1.20-2.80 mg/ml ($r=0.999\ 5$) and 1.17-2.73 mg/ml ($r=0.999\ 6$); and the average recoveries were 100.2% (RSD=0.36%) and 100.3% (RSD=0.28%). CONCLUSIONS: The method is convenient, accurate and sensitive, and it is suitable for the simultaneous determination of diisopropylamine dichloroacetate and calcium gluconate in Compound diisopropylamine dichloroacetate tablets.

KEY WORDS Compound diisopropylamine dichloroacetate tablets; Calcium gluconate; Content determination; HPLC

复方二氯醋酸二异丙胺片由二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙组成,具有改善肝功能、抑制或降低脂肪在肝内沉积及防止肝细胞损伤的功能,对受损的肝细胞,也有促进其再生的作用;同时葡萄糖酸钙还可补充肝病患者所缺乏的微量元素^[1]。临床上该药主要用于急、慢性肝炎(包括慢性迁延性肝炎),脂肪肝、早期肝硬化、肝细胞性黄疸以及其他肝功能障碍;还可用于中风后遗症、脑溢血、动脉硬化症、高血压、心绞痛、心肌梗死、心肌炎及心脏功能不全所引起的各种障碍^[2]。国家药品标准^[3]中该片剂的含量测定方法为:采用高氯酸滴定法测定二氯醋酸二异丙胺含量,采用乙二胺四乙酸二钠滴定法测定葡萄糖酸钙含量。由于该法操作烦琐,且受辅料干扰影响较大,常出现含量偏高的结果。笔者建立了高效液相色谱(HPLC)法测定复方二氯醋酸二异丙胺片含量,同时进行了方法学研究。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪、SPD-20A紫外检测器、LCsolution色谱工作站(日本岛津公司);AB-135S电子天平、DELTA 320pH计(瑞士梅特勒-托利多公司);SK7200HP超声波清洗器(上海

科导超声波仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方二氯醋酸二异丙胺片(海南凯健制药有限公司,批号:120601、120602、120603、120701、120702、120703,规格:每片含二氯醋酸二异丙胺20 mg、葡萄糖酸钙19.48 mg);二氯醋酸二异丙胺对照品(批号:100669-200501,纯度:100.0%)、葡萄糖酸钙对照品(批号:100082-199701,纯度:100.0%)均来源于中国食品药品检定研究院;乙腈、四氢呋喃均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钠23.4 g,加水900 ml使溶解,加乙腈100 ml,再加10%四丁基氢氧化铵50 ml,混匀,用稀磷酸或三乙胺调节pH值至7.0,加四氢呋喃65 ml),流速:1.0 ml/min;检测波长:205 nm;进样量:20 μl;柱温:室温。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液:精密称取二氯醋酸二异丙胺对照品100 mg与葡萄糖酸钙对照品97.5 mg,置于50 ml量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,制成每1 ml中分别含二氯醋酸二异丙胺2.00 mg和葡萄糖酸钙1.95 mg的混合溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液:精密称取经研细后的样品粉末1.2 g(约相

* 助理工程师。研究方向:药物分析。电话:0898-65715665。E-mail:2353184301@qq.com

通信作者:实验师。研究方向:药物分析、实验教学。电话:0898-66893763。E-mail:yangliu009@126.com

当于含二氯醋酸二异丙胺 200 mg 与葡萄糖酸钙 194.8 mg), 置于 100 ml 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 制成每 1 ml 中分别含二氯醋酸二异丙胺 2.00 mg 和葡萄糖酸钙 1.95 mg 的混合溶液, 过滤, 即得供试品溶液。

2.2.3 空白辅料溶液: 精密称取混合均匀后的辅料粉末 1.2 g, 置于 100 ml 量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下的对照品、供试品和空白辅料 3 种溶液各 20 μ l, 进样测定, 记录色谱图。结果, 葡萄糖酸钙和二氯醋酸二异丙胺的保留时间分别为 2.999、7.516 min。理论板数以二氯醋酸二异丙胺计不低于 5 000, 葡萄糖酸钙和二氯醋酸二异丙胺与相邻峰的分度均大于 1.5, 空白辅料不干扰主成分的测定。色谱见图 1。

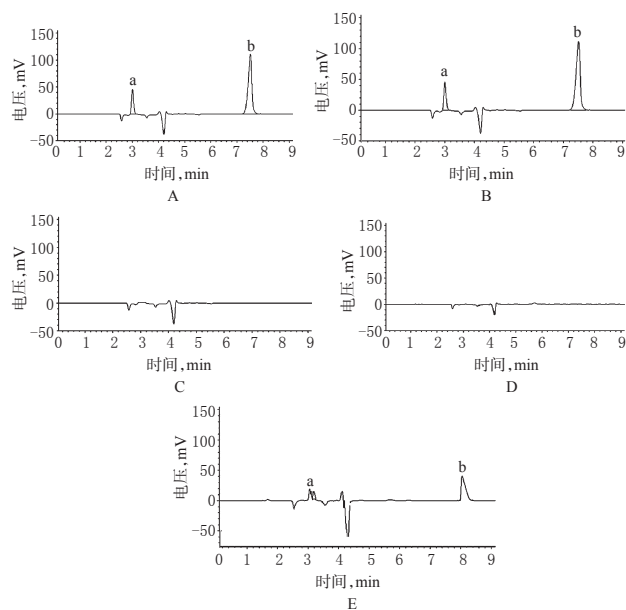


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品 (批号: 120601); C. 水; D. 空白辅料; E. 文献方法 (批号: 120601); a. 葡萄糖酸钙; b. 二氯醋酸二异丙胺

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference substance; B. test sample (batch number: 120601); C. water; D. blank excipients; E. the method of references (batch number: 120601); a. calcium gluconate; b. diisopropylamine dichloroacetate

2.4 线性关系考察

精密量取对照品溶液 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 ml, 分别置于 5 个 10 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 制成含二氯醋酸二异丙胺 1.20、1.60、2.00、2.40、2.80 mg/ml 和含葡萄糖酸钙 1.17、1.56、1.95、2.34、2.73 mg/ml 的 5 份混合溶液。分别进样 20 μ l 进行分析, 记录色谱图。以溶液质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得到二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的回归方程分别为 $y=1\ 156\ 811x+162\ 494$ ($r=0.999\ 5$) 和 $y=164\ 850x+96\ 388$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明, 二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的检测质量浓度线性范围分别为 1.20~2.80、1.17~2.73 mg/ml。

2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图,

结果, 二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的峰面积的 RSD 分别为 0.93% 和 0.80%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批号的复方二氯醋酸二异丙胺片平行配制 6 份供试品溶液, 进样测定其含量。结果, 二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的峰面积的 RSD 分别为 1.36%、1.01%, 表明本法重复性好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液, 放置在室温条件下, 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 取样, 进样分析, 记录色谱图。结果, 二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的峰面积的 RSD 分别为 0.79% 和 0.86%, 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验

分别精密称取二氯醋酸二异丙胺对照品各约 16、20、24 mg 和葡萄糖酸钙对照品各约 15.6、19.5、23.4 mg, 一一对应, 分别置于 10 ml 量瓶中, 并按处方比例分别加入空白辅料, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 配制相当于 80%、100%、120% 的低、中、高 3 个不同质量浓度的供试品溶液, 每个浓度平行配制 3 份。以对照品溶液作为对照, 按照“2.9”项下方法进行含量测定, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算回收率和 RSD, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 (n=9)

Tab 1 Results of recovery tests (n=9)

组分	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
二氯醋酸二异丙胺	16.12	16.08	99.75	100.2	0.36
	16.18	16.31	100.80		
	16.85	16.96	100.65		
	20.16	20.20	100.19		
	20.30	20.27	99.85		
	20.26	20.30	100.20		
	24.23	24.34	100.45		
	24.35	24.42	100.28		
	24.12	24.09	99.88		
葡萄糖酸钙	15.62	15.59	99.81	100.3	0.28
	15.58	15.62	100.26		
	15.65	15.74	100.58		
	19.55	19.67	100.61		
	19.61	19.58	99.85		
	19.59	19.65	100.31		
	23.45	23.50	100.21		
	23.43	23.49	100.26		
	23.39	23.50	100.47		

2.9 样品含量测定

取复方二氯醋酸二异丙胺片 6 批样品, 按照“2.2”项下的方法配制供试品溶液和对照品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 以外标法计算样品中二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 波长的选择

由于二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙在 200~300 nm 波长范围无最大吸收, 所以利用末端吸收来分析。笔者取对照品溶液在 200~220 nm 的波长内进行全波段扫描, 发现在 205 nm 波长时二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的 2 个吸收峰吸收

表2 样品含量测定结果($n=6$)Tab 2 Results of content determination of samples ($n=6$)

批号	占标示量百分含量, %	
	二氯醋酸二异丙胺	葡萄糖酸钙
120601	101.3	100.5
120602	100.5	100.2
120603	100.6	99.7
120701	99.8	100.4
120702	100.8	100.7
120703	100.4	100.6

值最强,峰形最好,且辅料倒峰最小,故检测波长选为205 nm。

3.2 流动相的选择

由于二氯醋酸二异丙胺极性较大,其水溶液显弱酸性,在 C_{18} 色谱柱上基本无保留,因此可以在流动相中加入离子对试剂。分析酸类或带负电荷的物质,常用四丁基铵和十六烷基三甲胺季铵盐为离子对试剂,浓度一般为3~10 mmol/L^[4]。叶伟峰等^[5]采用四丁基溴化铵为离子对试剂,流动相为1.0 mmol/L 四丁基溴化铵溶液(用氨水调pH至7.2)-乙腈(72:28),在207 nm波长处测定二氯醋酸二异丙胺的含量。笔者用此法测定样品,结果未能检测到葡萄糖酸钙的峰,二氯醋酸二异丙胺峰也未能与辅料峰达到基线分离,且峰形略有拖尾。陈航等^[6]用流动相为0.19% NaCl溶液,采用氨基柱,柱温35℃,在220 nm波长处测定复方二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钠注射液的含量。该法流动相含有卤素离子,对管路中的不锈钢材料有腐蚀作用,不利于仪器的保养维护;且采用较高柱温,对色谱柱的寿命有一定影响;峰形不对称,辅料峰对葡萄糖酸钙峰有明显的干扰。陈秀琳^[7]采用流动相为磷酸盐缓冲液(磷酸二氢钠15.6 g,加水900 ml使溶解,加乙腈100 ml,加10%四丁基氢氧化铵50 ml,混匀,用稀磷酸或1 mol/L NaOH溶液调节pH值至6.5,加四氢吡喃65 ml), C_{18} 柱,柱温35℃,在210 nm波长处测定复方二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钠注射液的含量。笔者采用该法测定复方二氯醋酸二异丙胺片,结果两种成分虽能达到基本分离,但葡萄糖酸钙与相邻的杂质峰之间未能有效地分离,分离度小于1.5;而且葡萄糖酸钙峰高太小,二氯醋酸二异丙胺峰形较宽,有拖尾现象(见图1E)。且该流动相用NaOH调节pH值,但由于样品为弱酸,NaOH没有缓冲作用,那么流动相与样品混合后pH值会立刻下降,不利于色谱峰的分离和检测的稳定^[4]。根据孙祥德等^[8]报道,通过调节缓冲液中 NaH_2PO_4 的含量可以改善葡萄糖酸钙的峰形,同时由于三乙胺能够屏蔽色谱填料中硅羟基的解离,减少样品中碱性组分的拖尾,所以,笔者在陈秀琳^[7]的方法的基础上,将 NaH_2PO_4 含量提高至0.12 mol/L,且将pH值调节剂改为三乙胺,等度洗脱,室温下分析。结果发现两种主成分峰

形有了明显的改善,分析时间也缩短,而且能满足系统适用性要求。因此用此流动相进行复方二氯醋酸二异丙胺片的HPLC法含量测定。

3.3 流动相pH值

二氯醋酸二异丙胺和葡萄糖酸钙的水溶液显弱酸性($pK_a > 2$),调节流动相的pH值使试样组分与离子对试剂全部离子化,将有利于离子对的形成,改善弱酸试样的保留值和分离选择性^[4]。一般试样的 $pK_a > 2$,离子对试剂为季铵盐时,流动相pH值适合范围为5.0~7.5^[4]。笔者将“3.2”项下确定的流动相pH值用磷酸或三乙胺分别调至5.0、6.0、6.5、7.0、7.5,考察色谱行为。结果pH值在7.0时拖尾因子最小,葡萄糖酸钙与相邻的杂质峰之间分离效果最好,分离度大于1.5,峰形对称。

3.4 溶剂的选择

文献报道^[4-6]中的样品溶液配制均采用流动相来溶解并稀释,本片剂中的另一主药为葡萄糖酸钙,与葡萄糖酸钠性质略有不同。笔者在试验过程中发现葡萄糖酸钙在流动相中几乎不溶解,根据葡萄糖酸钙的理化性质,笔者选择用水作为溶剂并通过超声处理的办法来溶解样品。因此确定采用水作为溶剂来配制样品溶液。

参考文献

- [1] Rastopchin IP. Effect of calcium pangamate on the cholesterol index of atherogenicity in cerebral arteriosclerosis patients[J]. Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova, 1984, 84(7): 1 020.
- [2] 张文康,潘学田.中国进口药品实用手册:1996—1997[M].北京:科学技术出版社,1997:173-174.
- [3] 国家食品药品监督管理局.YBH01732009 复方二氯醋酸二异丙胺片[S].2009-01-24.
- [4] 李发美.分析化学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2007:390-399.
- [5] 叶伟峰,林艳,王珏.HPLC法测定二氯醋酸二异丙胺含量[J].儿科药学杂志,2007,13(1):32.
- [6] 陈航,纪宇,邓丽明.HPLC法同时测定复方二氯醋酸二异丙胺注射液两组分的含量[J].中国药品标准,2007,8(5):42.
- [7] 陈秀琳.高效液相法同时测定复方二氯醋酸二异丙胺注射液两组分的含量[J].海峡药学,2009,21(1):31.
- [8] 孙祥德,高革,赵俊环,等.高效液相色谱法同时测定复方葡萄糖酸钙口服液中2组分的含量[J].中国药房,2005,16(17):1 334.

(收稿日期:2013-02-06 修回日期:2013-03-20)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅