

HPLC法测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中的有关物质

李亚萍^{1*},王静²,周立新²,陆步实^{2#}(1.南京工业大学药学院,南京 211816;2.江苏省药物研究所有限公司,南京 210009)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)12-1714-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.12.36

摘要 目的:建立测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry C₁₈,流动相为[水-乙腈-三氟乙酸(90:10:0.1,V/V/V)]-[水-乙腈-三氟乙酸(10:90:0.1,V/V/V)](梯度洗脱),流速为0.6 mL/min,检测波长为237 nm(杂质A)和225 nm(杂质B、C、D),柱温为30 ℃。结果:杂质A、B、C、D检测质量浓度线性范围分别为93.43~987.34 ng/mL($r=0.999\ 4$)、12.27~255.92 ng/mL($r=0.999\ 6$)、78.96~657.17 ng/mL($r=0.999\ 9$)、28.39~218.16 ng/mL($r=0.999\ 7$);定量限分别为91.27、11.35、78.31、26.56 ng,检测限分别为22.98、3.13、19.17、8.16 ng;精密度的RSD<2.0%,稳定性、重复性试验中只检出杂质A,RSD=0.79%;回收率分别为99.4%~100.6%(RSD=0.41%, $n=9$)、98.9%~102.0%(RSD=1.04%, $n=9$)、99.4%~100.9%(RSD=0.56%, $n=9$)、98.6%~101.2%(RSD=0.92%, $n=9$)。结论:该方法简便、快速、灵敏、重复性好,可用于测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中的有关物质。

关键词 氨氯地平;氢氯噻嗪;缬沙坦;有关物质;高效液相色谱法;氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片

Determination of Related Substance in Amlodipine Hydrochlorothiazide and Valsartan Tablets by HPLC

LI Yaping¹, WANG Jing², ZHOU Lixin², LU Bushi²(1.College of Pharmacy, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China;2.Jiangsu Province Institute of Materia Medica Co.,Ltd., Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of related substances in Amlodipine hydrochlorothiazide and valsartan tablets. METHODS: HPLC method was used. The determination was performed on Symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile-trifluoroacetic acid (90:10:0.1, V/V/V) and water-acetonitrile-trifluoroacetic (10:90:0.1, V/V/V) (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was set at 237 nm (impurity A) and 225 nm (impurity B, C, D). The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear range of impurity A, B, C, D were 93.43-987.34 ng/mL ($r=0.999\ 4$), 12.27-255.92 ng/mL ($r=0.999\ 6$), 78.96-657.17 ng/mL ($r=0.999\ 9$), 28.39-218.16 ng/mL ($r=0.999\ 7$), respectively. The limits of quantitation were 91.27, 11.35, 78.31, 26.56 ng; the limits of stability and detection were 22.98, 3.13, 19.17, 8.16 ng. RSDs of precision tests were lower than 2.0%. Only impurity A was found in repeatability test, RSD=0.79%. Recoveries were 99.4%-100.6% (RSD=0.41%, $n=9$), 98.9%-102.0% (RSD=1.04%, $n=9$), 99.4%-100.9% (RSD=0.56%, $n=9$), 98.6%-101.2% (RSD=0.92%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, sensitive and repeatable, and can be used for the determination of related substance in Amlodipine hydrochlorothiazide and valsartan tablets.

KEYWORDS Amlodipine; Hydrochlorothiazide; Valsartan; Related substance; HPLC; Amlodipine hydrochlorothiazide and valsartan tablets

氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片是2009年FDA批准诺华公司研发的复方制剂,商品名为Exforge HCT,其主要成分为氨氯地平(Amlodipine)、氢氯噻嗪(Hydrochlorothiazide)和缬沙坦(Valsartan),均为长效降压药,本制剂适用于单一药物治疗不能控制血压的患者,其中氨氯地平属于钙离子拮抗药,氢氯噻嗪属于利尿药,缬沙坦属于血管紧张素II受体拮抗药^[1],这3种成分可通过不同的机制发挥降压作用,疗效及耐受性均较好,大大提高了患者用药依从性^[2];此外,该制剂对靶器官有较好的保护作用^[3-6]。

现有文献只对氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中1种或2种主要成分的有关物质进行分析,未有同时测定该制剂中3种主要成分的有关物质的报道^[7-10],因此笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中有关物质的方法,以期完善该制剂的质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括1260型可变波长紫外检测器、安捷伦工作站等(美国Agilent公司);UV-2450型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);BS21S型电子天平(德国Sartorius公司);KQ-200KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz)。

* 硕士研究生。研究方向:药剂学。电话:025-58139411。
E-mail:liyaping0816@163.com

通信作者:研究员,硕士。研究方向:药物制剂。E-mail:
bushi89@163.com

1.2 药品与试剂

氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片(江苏省药物研究所有限公司,批号:140506、140507、140508,规格:每片含氨氯地平5 mg,氢氯噻嗪12.5 mg,缬沙坦80 mg);氨氯地平对照品(批号:100374-201204,纯度:99.6%)、氢氯噻嗪对照品(批号:100309-201103,纯度:99.0%)、缬沙坦对照品(批号:100651-200902,纯度:98.9%)均购自中国食品药品检定研究院;杂质A对照品(批号:G0L172,纯度:99.5%)、杂质B对照品(批号:I0F027,纯度:98.2%)、杂质C对照品(批号:H1K270,纯度:99.5%)均购自美国药典委员会;杂质D对照品(江苏省药物研究所有限公司,批号:201405,纯度:98.5%);乙腈、三氟乙酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈(150 mm×3.0 mm,5 μm);流动相:[水-乙腈-三氟乙酸(90:10:0.1,V/V/V)](A)-[水-乙腈-三氟乙酸(10:90:0.1,V/V/V)](B),梯度洗脱(0 min,80% A;20 min,20% A;25 min,80% A;35 min,80% A);流速:0.6 mL/min;检测波长:237 nm(杂质A)和225 nm(杂质B、C、D);柱温:30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取杂质A对照品10 mg、杂质B对照品2.5 mg、杂质C对照品6.4 mg和杂质D对照品5 mg,置于同一100 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1,V/V)定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。取上述混合对照品贮备液10 mL,置于100 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1,V/V)定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品细粉适量(相当于氨氯地平5 mg),置于100 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1,V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

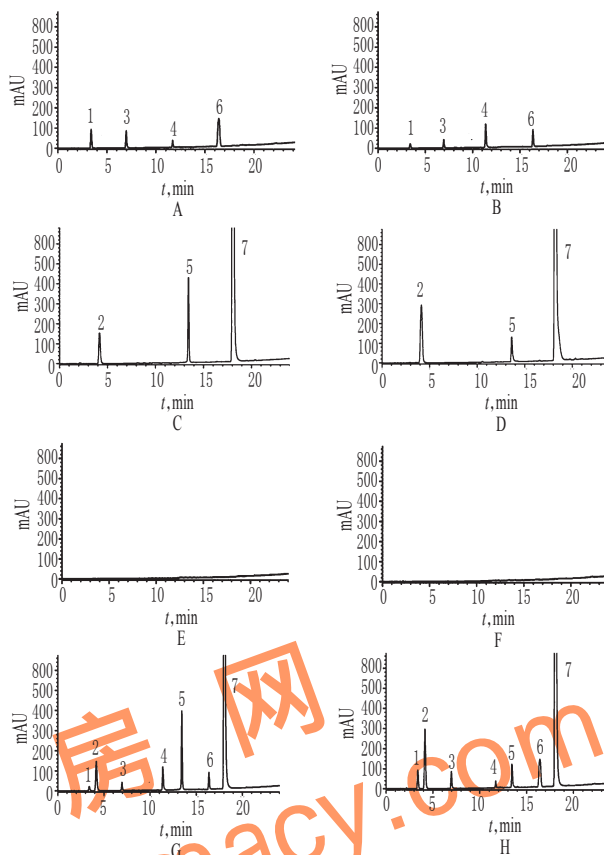
2.2.3 空白溶液 精密称取处方量的空白辅料适量,置于100 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1,V/V)定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 系统适用性溶液 精密称取氨氯地平对照品5 mg、氢氯噻嗪对照品12.5 mg和缬沙坦对照品20 mg,置于同一100 mL量瓶中,加入“2.2.1”项下混合对照品贮备液10 mL,加乙腈-水(1:1,V/V)定容,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液、系统适用性溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以氨氯地平峰计≥2 500,氨氯地平保留时间为13.349 min、氢氯噻嗪保留时间为4.168 min、缬沙坦保留时间为17.975 min、杂质A保留时间为11.620 min、杂质B保留时间为3.412 min、杂质C保留时间为16.336 min、杂质D保留时间为6.958 min。结果表明,其他成分对

测定无干扰。



A.混合对照品溶液(237 nm);B.混合对照品溶液(225 nm);C.供试品溶液(237 nm);D.供试品溶液(225 nm);E.空白溶液(237 nm);F.空白溶液(225 nm);G.系统适用性溶液(237 nm);H.系统适用性溶液(225 nm);1.杂质B;2.氢氯噻嗪;3.杂质D;4.杂质A;5.氨氯地平;6.杂质C;7.缬沙坦

A.mixed control solution (237 nm); B.mixed control solution (225 nm); C. test sample solution (237 nm); D. test sample solution (225 nm); E. blank solution (237 nm); F. blank solution (225 nm); G. system suitability solution (237 nm); H. system suitability solution (225 nm); 1. impurity B; 2. hydrochlorothiazide; 3. impurity D; 4. impurity A; 5. amlodipine; 6. impurity C; 7. valsartan

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of system suitability test

2.4 破坏性试验

2.4.1 酸破坏样品溶液 精密称取样品(批号:140506)适量,置于50 mL量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液2 mL,于室温下放置2 h,加1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL调节pH至中性,再加乙腈-水(1:1,V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.2 碱破坏样品溶液 精密称取样品(批号:140506)适量,置于50 mL量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL,于室温下放置2 h,加1 mol/L盐酸溶液2 mL调节pH至中性,再加乙腈-水(1:1,V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.3 氧化破坏样品溶液 精密称取样品(批号:140506)适量,置于50 mL量瓶中,加30%过氧化氢溶液

1 mL,于室温下放置2 h,加乙腈-水(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.4 高温破坏样品溶液 精密称取样品(批号:140506)适量,置于50 mL量瓶中,于沸水(100 ℃)中加热5 h,加乙腈-水(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

2.4.5 光破坏样品溶液 精密称取样品(批号:140506)适量,置于50 mL量瓶中,于人工气候箱中(温度:25 ℃,照度:4 500 lx)照射18 h,加乙腈-水(1:1, V/V)溶解并定容,摇匀,即得。

取上述各破坏样品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。由图2可知,本品在上述条件下,产生的降解产物均能与主成分峰达到有效分离。

2.5 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测杂质质量浓度(x , ng/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得杂质A、B、C、D回归方程分别为 $y=0.125x-4.1305$ ($r=0.9994$)、 $y=0.0676x+0.1003$ ($r=0.9996$)、 $y=0.0907x-1.4869$ ($r=0.9999$)、 $y=0.0816x-1.395$ ($r=0.9997$)。结果表明,杂质A、B、C、D检测质量浓度线性范围分别为93.43~987.34、12.27~255.92、78.96~657.17、28.39~218.16 ng/mL。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,杂质A、B、C、D的LOQ分别为91.27、11.35、78.31、26.56 ng, LOD分别为22.98、3.13、19.17、8.16 ng。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,杂质A、B、C、D峰面积的RSD分别为1.01%、0.39%、1.22%、0.98% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

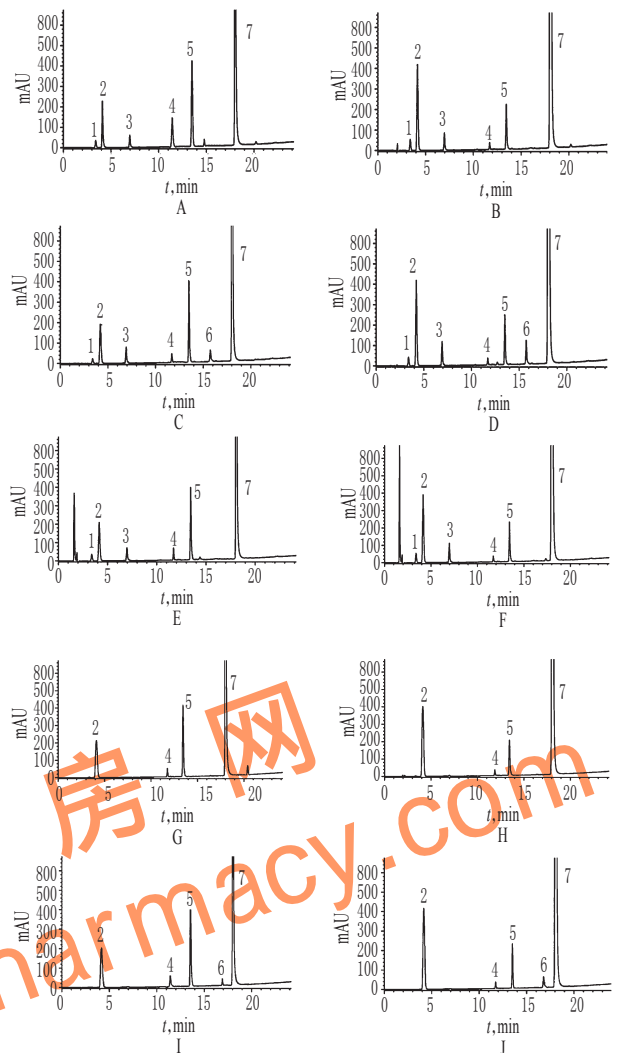
取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,杂质D峰面积的RSD为0.98% ($n=5$),其他成分未检出,表明供试品溶液在室温放置8 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品细粉(批号:140506)适量,共6份,按“2.2.2”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,记录峰面积。结果,杂质A峰面积的RSD=0.79% ($n=6$),其他成分未检出,表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验

精密称取杂质A、B、C、D各适量,共9份,分别置于100 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1, V/V)溶解并定容,按



A.酸破坏样品(237 nm);B.酸破坏样品(225 nm);C.碱破坏样品(237 nm);D.碱破坏样品(225 nm);E.氧化破坏样品(237 nm);F.氧化破坏样品(225 nm);G.高温破坏样品(237 nm);H.高温破坏样品(225 nm);I.光破坏样品(237 nm);J.光破坏样品(225 nm);1.杂质B;2.氢氯噻嗪;3.杂质D;4.杂质A;5.氨氯地平;6.杂质C;7.缬沙坦
A.destroyed by acid (237 nm); B.destroyed by acid (225 nm); C. destroyed by alkali (237 nm); D. destroyed by alkali (225 nm); E. destroyed by oxidation (237 nm); F. destroyed by oxidation (225 nm); G. destroyed by high temperature (237 nm); H. destroyed by high temperature (225 nm); I. destroyed by light (237 nm); J. destroyed by light (225 nm); 1. impurity B; 2. hydrochlorothiazide; 3. impurity D; 4. impurity A; 5. amlodipine; 6. impurity C; 7. valsartan

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

“2.2.2”项下方法制成低、中、高3种不同质量浓度的供试品溶液,再按“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。

2.11 样品有关物质测定

取3批样品(批号:140506、140507、140508)各适量,按“2.2.2”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,记录峰面积并按外标法计算样品中的有关物质。结果,3批样品中只有1批(批号:140508)只检

测出杂质D,其含量为0.01%。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测杂质	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
杂质A	0.398 0	0.396 0	99.5	99.95	0.41
	0.398 0	0.399 3	100.3		
	0.398 0	0.396 7	99.7		
	0.497 5	0.500 5	100.6		
	0.497 5	0.499 3	100.4		
	0.497 5	0.497 9	100.1		
	0.597 0	0.595 5	99.7		
	0.597 0	0.596 0	99.8		
	0.597 0	0.593 7	99.4		
	杂质B	0.098 2	0.099 2		
0.098 2		0.097 9	99.7		
0.098 2		0.100 1	101.9		
0.122 8		0.122 9	100.1		
0.122 8		0.121 5	98.9		
0.122 8		0.124 3	101.2		
0.147 4		0.150 3	102.0		
0.147 4		0.149 8	101.6		
0.147 4		0.148 5	100.7		
杂质C		0.254 7	0.256 7	100.8	100.19
	0.254 7	0.255 3	100.2		
	0.254 7	0.256 3	100.6		
	0.318 4	0.321 4	100.9		
	0.318 4	0.319 8	100.4		
	0.318 4	0.316 5	99.4		
	0.382 1	0.380 1	99.5		
	0.382 1	0.382 6	100.1		
	0.382 1	0.381 0	99.7		
	杂质D	0.220 6	0.218 7	99.1	
0.220 6		0.221 0	100.2		
0.220 6		0.218 1	98.9		
0.287 6		0.289 1	100.5		
0.287 6		0.291 1	101.2		
0.287 6		0.283 5	98.6		
0.331 0		0.333 9	100.9		
0.331 0		0.331 8	100.2		
0.331 0		0.330 1	99.7		

3 讨论

3.1 检测波长和柱温的选择

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,在200~400 nm 波长处进行全波长扫描,发现在237 nm 波长处杂质A 有最大吸收,在225 nm 波长处杂质B、C、D 有较大吸收,因此最终确定本试验的检测波长为237 nm(杂质A)和225 nm(杂质B、C、D)。在预试验中,笔者发现温度过低会导致氨氯地平、氢氯噻嗪和缬沙坦主峰与其相邻的有关物质峰分离度不佳,造成干扰,故选用30 ℃为本试验的柱温。

3.2 有关物质的确定

根据氨氯地平、氢氯噻嗪和缬沙坦原料的合成路线

和可能的降解模式,氨氯地平涉及的有关物质为杂质A,其在氧化、光照及高温条件下均可产生;氢氯噻嗪涉及的有关物质有氯噻嗪、氢氯噻嗪二聚物和苯并噻二嗪(即杂质B),其中氯噻嗪是合成过程中间产物,氢氯噻嗪二聚物是合成过程中的副产物,杂质B是氢氯噻嗪降解产物及该药质量控制中的主要有关物质^[4-5];缬沙坦涉及的有关物质有杂质C、杂质E及缬沙坦水解产物(杂质D)^[6],其中杂质E是缬沙坦的手性异构体,其检测可在另一色谱系统下用手性色谱柱进行研究,本系统不对杂质E做具体说明,杂质C是缬沙坦同系物副产物,杂质D为缬沙坦水解产物。

综上所述,本方法简便、快速、灵敏、重复性好,可用于测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中的有关物质。

参考文献

- [1] 刘晓云,宋建国.抗高血压单片复方制剂缬沙坦/氨氯地平临床药理学研究进展[J].中国执业药师,2011,8(12):31-36.
- [2] 马培奇.欧美批准第一个“三合一”类抗高血压复合制剂Ex-forge HCT[J].上海医药,2010,31(1):20.
- [3] 李勇.联合降压药物固定剂量复方制剂的药物选择:血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂+钙离子通道阻滞剂的临床意义[J].中国新药杂志,2010,19(18):1671-1675.
- [4] 吴善霞,刘延风.HPLC法同时测定缬沙坦氢氯噻嗪片中两组分的含量[J].科学研究,2012,32(3):153-155.
- [5] 王焕,王国振.氢氯噻嗪分散片中有关物质苯并噻二嗪有关物质A的研究[J].河北医药,2012,34(16):2519-2521.
- [6] 吴迪,郭伟英.HPLC 色谱法同时测定缬沙坦氢氯噻嗪中缬沙坦和氢氯噻嗪的含量[J].中国药房,2012,23(9):846-847.
- [7] 吕晴,郝玲花,李东辉,等.高效液相色谱法测定缬沙坦氢氯噻嗪片有关物质[J].中国新药杂志,2014,23(15):1754-1810.
- [8] 邢小燕,王勇军,徐丽洁,等.高效液相色谱法测定缬沙坦氨氯地平片中的有关物质[J].中国新药杂志,2013,22(19):2323-2331.
- [9] 彭熙琳,吴品江,周唯兰,等.应用高效液相色谱法测定缬沙坦氨氯地平片有关物质[J].重庆医学,2014,43(17):2175-2177.
- [10] 魏春燕,沈利,王延松,等.HPLC法测定复方氨氯地平缬沙坦片有关物质[J].中国药师,2011(8):1142-1144.

(收稿日期:2016-05-22 修回日期:2017-01-22)

(编辑:刘柳)