

HPLC法同时测定复方罗布麻片 I 中硫酸双胍屈嗪和3种维生素的含量[△]

徐 硕*,金鹏飞[#](北京医院药学部/国家老年医学中心/药物临床风险与个体化应用评价北京市重点实验室,北京 100730)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0607-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.08

摘要 目的:建立同时测定复方罗布麻片 I 中维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆、维生素 B₅含量的方法。方法:采用高效液相色谱法对2家企业共8批次样品进行含量测定。色谱柱为 Waters XBridge C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.5 mL/min,检测波长为285 nm(维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆)、210 nm(维生素 B₅),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆、维生素 B₅检测质量浓度线性范围分别为41.66~208.3、127.0~635.0、40.74~203.7、22.72~113.6 μg/mL(r 均为0.999 9);定量限分别为0.267、0.274、0.062、0.124 μg/mL,检测限分别为0.095、0.088、0.021、0.039 μg/mL;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD均<2.0%($n=6$);平均加样回收率分别为98.70%(RSD=0.69%, $n=9$)、99.74%(RSD=1.2%, $n=9$)、99.89%(RSD=1.0%, $n=9$)、99.25%(RSD=1.2%, $n=9$)。测定的8批样品中,维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆、维生素 B₅含量分别为标示量的91.44%~98.74%、36.68%~95.23%、92.42%~97.90%、91.36%~99.48%,其中硫酸双胍屈嗪的含量差异较大,最低值与最高值间相差2.6倍。结论:该方法准确可靠、操作简便,可用于同时测定复方罗布麻片 I 中上述4种成分的含量。**关键词** 高效液相色谱法;复方罗布麻片 I;维生素 B₁;硫酸双胍屈嗪;维生素 B₆;维生素 B₅;含量

Simultaneous Determination of Dihydralazine Sulfate and Three Vitamins in Compound *Apocynum venetum* Tablets I by HPLC

XU Shuo, JIN Pengfei (Dept. of Pharmacy, Beijing Hospital/National Center of Gerontology/Beijing Key Lab of Drug Clinical Risk and Personalized Medication Evaluation, Beijing 100730, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of vitamin B₁, dihydralazine sulfate, vitamin B₆ and vitamin B₅ in Compound *Apocynum venetum* tablets I. METHODS: HPLC method was used for content determination of 8 batches of samples from 2 enterprises. The determination was performed on Waters XBridge C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelengths were set at 285 nm (vitamin B₁, dihydralazine sulfate, vitamin B₆) and 210 nm (vitamin B₅). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of vitamin B₁, dihydralazine sulfate, vitamin B₆ and vitamin B₅ were 41.66-208.3 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 127.0-635.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 40.74-203.7 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 22.72-113.6 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantitation were 0.267, 0.274, 0.062, 0.124 μg/mL, respectively. The limits of detection were 0.095, 0.088, 0.021, 0.039 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The average recoveries were 98.70% (RSD=0.69%, $n=9$), 99.74% (RSD=1.2%, $n=9$), 99.89% (RSD=1.0%, $n=9$), 99.25% (RSD=1.2%, $n=9$), respectively. Among 8 batches of samples, the contents of vitamin B₁, dihydralazine sulfate, vitamin B₆ and vitamin B₅ were 91.44%-98.74%, 36.68%-95.23%, 92.42%-97.90%, 91.36%-99.48% of labelled amount, respectively. The contents of dihydralazine sulfate were significantly different and differed by 2.6 times between the lowest and the highest threshold value. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable, simple and can be used for simultaneous determination of the above 4 components in Compound *A. venetum* tablets I.

KEYWORDS HPLC; Compound *Apocynum venetum* tablets I; Vitamin B₁; Dihydralazine sulfate; Vitamin B₆; Vitamin B₅; Content

[△]基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81303216);北京医院“科技新星”项目(No.BJ-2016-039)

*主管药师,博士。研究方向:药物分析。电话:010-85133621。E-mail:jessica06250917@126.com

[#]通信作者:副主任药师,博士。研究方向:药物分析。电话:010-85133620。E-mail:j790101@163.com

复方罗布麻片 I 是由罗布麻叶、野菊花、防己、硫酸双胍屈嗪、氢氯噻嗪、盐酸异丙嗪、维生素 B₁、维生素 B₆ 和维生素 B₅组成的中西药复方制剂,临床用于治疗高血压^[1-3]。现行国家标准仅对其中的氢氯噻嗪进行了含量测定^[4],而对处方中其他活性成分的含量没有规定,显然

不能有效地控制该药品的质量。

复方罗布麻片 I 中的化学成分较为复杂。本研究在样品提取方法摸索过程中发现,复方罗布麻片 I 中各成分之间的极性、理化性质和色谱行为差异较大,在处方中所含的 6 种化学药成分中,维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 的极性较高,采用同一种提取方法无法从样品中将这 4 种化学药成分与其他 2 种化学药成分和中药活性成分提取完全,难以同时进行定量分析,因此需要建立一种可以同时对这 4 种高极性成分进行含量测定的方法。现有关于复方罗布麻片 I 中 6 种化学药成分的含量测定的文献中,多数只测定了其中的 1~3 种成分^[5-11],尚未见对维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 4 种成分同时进行定量分析的报道。

本研究采用高效液相色谱(HPLC)法,建立了同时测定复方罗布麻片 I 中维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 4 种成分含量的方法。

1 材料

1.1 仪器

1260 HPLC 仪,包括 G1311C 四元梯度泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G4212B 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);XP205 十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);KQ-800KDE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

复方罗布麻片 I (山西云鹏制药有限公司,批号:F160805、D161206、D160510、D160904、D160604;亚宝药业集团股份有限公司,批号:180631、180128、150504,规格:每片均含维生素 B₁ 0.5 mg、维生素 B₆ 0.5 mg、维生素 B₅ 0.25 mg、硫酸双胍屈嗪 1.6 mg);维生素 B₁ 对照品(批号:15H0279,纯度:99%)、维生素 B₆ 对照品(批号:15H0278,纯度:99%)、维生素 B₅ 对照品(批号:35H0772,纯度:99%)均购自美国 Sigma 公司;硫酸双胍屈嗪对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100514-200301,纯度:100%);乙腈和磷酸为色谱纯;试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 2%→3% A; 5~10 min, 3% A; 10~16 min, 3%→4% A; 16~20 min, 4%→5% A; 20~23 min, 5%→10% A; 23~43 min, 10% A);流速:0.5 mL/min;检测波长:285 nm(维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 的保留时间分别为 6.29、7.55、13.78 min)、210 nm(维生素 B₅ 的保留时间为 30.28 min);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的准备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆、维生素 B₅ 对照品 41.66、127、40.74、22.72 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入 0.8% 磷酸溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,得维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆、维生素 B₅ 质量浓度分别为 833.2、2 540、814.8、454.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取复方罗布麻片 I 20 片,精密称定,研细,精密称取粉末适量(约相当于维生素 B₁ 与维生素 B₆ 各 2 mg,硫酸双胍屈嗪 6.4 mg,维生素 B₅ 1 mg),置于 25 mL 量瓶中,加入 0.8% 磷酸溶液 15 mL,振摇 2 min,超声(功率:800 W,频率:40 kHz) 45 min,加入 0.8% 磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 依据复方罗布麻片 I 说明书(山西云鹏制药有限公司)提供的配方,制备不含维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 这 4 种待测成分的阴性样品,按“2.2.2”项下方法操作,制备阴性对照溶液。

2.3 专属性与系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液进样分析,考察样品中其他成分和辅料对待测成分色谱峰是否有干扰。在“2.1”项下色谱条件下,4 种待测成分的理论板数以维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 计均大于 9 400,样品中 4 种待测成分色谱峰与相邻峰的分离度大于 1.5,表明样品中的其他成分及辅料不干扰维生素 B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素 B₆ 和维生素 B₅ 的测定。色谱图见图 1。

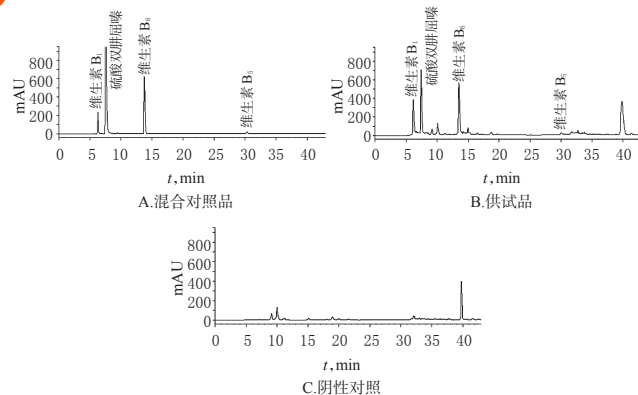


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 2.5、4、5、6、12.5 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,加入 0.8% 磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,获得一系列不同质量浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取上述系列混合对照品溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标(x, μg/mL)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,线性关系结果见表 1。

表1 4种成分线性关系结果

Tab 1 Linear relationships results of 4 kinds of components

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
维生素B ₁	$y=8.943x-1.659$	0.999 9	41.66~208.3
硫酸双胍屈嗪	$y=18.20x-97.69$	0.999 9	127.0~635.0
维生素B ₆	$y=49.51x-7.508$	0.999 9	40.74~203.7
维生素B ₅	$y=6.917x-0.790 3$	0.999 9	22.72~113.6

2.5 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”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,计算定量限;当信噪比为3:1时,计算检测限,结果见表2。

表2 4种成分的定量限与检测限测定结果($\mu\text{g/mL}$)Tab 2 Results of LOQ and LOD of 4 kinds of components($\mu\text{g/mL}$)

待测成分	定量限	检测限
维生素B ₁	0.267	0.095
硫酸双胍屈嗪	0.274	0.088
维生素B ₆	0.062	0.021
维生素B ₅	0.124	0.039

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆、维生素B₅峰面积的RSD分别为0.31%、0.24%、0.15%、0.32%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:F160805)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆、维生素B₅峰面积的RSD分别为0.43%、0.69%、0.34%、0.72%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:F160805)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样分析,记录峰面积并计算样品含量。结果,维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆、维生素B₅含量的RSD分别为1.3%、1.6%、0.97%、1.1%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已测知含量的同一批样品(批号:F160805),研细,精密称取9份,分成3组,每组3份,各组分别加入对照品溶液适量(分别相当于样品中各被测成分含量的80%、100%、120%),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,记录峰面积并计算各被测成分的回收率和RSD,结果见表3。

表3 回收率试验结果($n=9$)Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
维生素B ₁	1.920 3	1.666 4	3.557 4	98.24	98.70	0.69
	1.918 5	1.666 4	3.579 1	99.65		
	1.919 7	1.666 4	3.549 8	97.82		
	1.924 5	2.083 0	3.969 4	98.17		
	1.926 2	2.083 0	3.986 9	98.93		
	1.927 7	2.083 0	3.969 2	98.01		
	1.928 1	2.499 6	4.409 7	99.28		
	1.929 5	2.499 6	4.416 4	99.49		
	1.928 9	2.499 6	4.395 3	98.67		
硫酸双胍屈嗪	5.873 4	5.080 0	10.884 8	98.65	99.74	1.2
	5.880 9	5.080 0	11.001 5	100.80		
	5.885 7	5.080 0	10.938 8	99.47		
	5.889 5	6.350 0	12.133 5	98.33		
	5.893 9	6.350 0	12.275 7	100.50		
	5.887 2	6.350 0	12.319 8	101.30		
	5.886 4	7.620 0	13.459 9	99.39		
	5.895 7	7.620 0	13.384 6	98.28		
	5.898 3	7.620 0	13.586 9	100.90		
维生素B ₆	1.898 3	1.629 6	3.512 3	99.04	99.89	1.0
	1.895 1	1.629 6	3.522 6	99.87		
	1.900 2	1.629 6	3.504 2	98.43		
	1.902 6	2.037 0	3.941 7	100.40		
	1.904 1	2.037 0	3.965 5	101.20		
	1.899 9	2.037 0	3.925 6	99.45		
	1.896 5	2.444 4	4.377 6	101.50		
	1.903 4	2.444 4	4.322 4	98.96		
	1.907 7	2.444 4	4.357 0	100.20		
维生素B ₅	0.987 3	0.908 8	1.881 7	98.42	99.25	1.2
	0.972 9	0.908 8	1.874 5	99.21		
	0.979 5	0.908 8	1.878 9	98.97		
	1.002 6	1.136 0	2.157 9	101.70		
	1.009 7	1.136 0	2.146 8	100.10		
	1.015 9	1.136 0	2.129 7	98.05		
	1.018 8	1.363 0	2.380 0	99.85		
	1.006 4	1.363 0	2.344 1	98.13		
	0.994 6	1.363 0	2.341 2	98.78		

2.10 样品含量测定

取8批样品各适量,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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 8批样品含量测定结果($n=3$)Tab 4 Results of content determination of 8 batches of samples($n=3$)

样品批号	维生素B ₁		硫酸双胍屈嗪		维生素B ₆		维生素B ₅	
	含量,mg/片	相当于标示量,%	含量,mg/片	相当于标示量,%	含量,mg/片	相当于标示量,%	含量,mg/片	相当于标示量,%
F160805	0.482 9	96.58	1.476 7	92.29	0.489 5	97.90	0.247 3	98.92
160631	0.484 5	96.90	0.979 5	61.22	0.471 6	94.32	0.246 4	98.56
D161206	0.479 2	95.84	1.472 6	92.04	0.467 3	95.26	0.239 8	95.92
D160510	0.480 1	96.02	1.403 8	87.74	0.485 3	97.06	0.248 7	99.48
160128	0.468 4	93.68	0.586 9	36.68	0.479 5	95.90	0.235 2	94.08
D160904	0.457 2	91.44	1.069 1	66.82	0.462 1	92.42	0.228 4	91.36
D160604	0.478 7	95.74	1.523 7	95.23	0.477 3	95.46	0.230 9	92.36
150504	0.493 7	98.74	1.497 6	93.60	0.469 6	93.92	0.238 8	95.52

3 讨论

3.1 检测波长的选择

根据各成分在流动相中的紫外吸收谱图来确定检测波长。维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆分别在246、274、292 nm处有最大吸收,兼顾3种成分在样品色谱图中的响应值,综合考虑,最终选择285 nm作为检测波长。维生素B₅仅在194 nm有末端吸收,故选择210 nm作为检测波长。

3.2 色谱条件的优化

本研究考察了采用乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.2%磷酸、乙腈-0.5%磷酸溶液、乙腈-50 mmol/L磷酸二氢铵(含0.04%辛烷磺酸钠,磷酸调至pH 3.0)为流动相对4种成分的影响,结果显示用乙腈-0.2%磷酸、乙腈-0.5%磷酸溶液时的效果较好且基本一致,故选择乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相。文献报道的关于维生素B₆、维生素B₁、硫酸双胍屈嗪的含量测定,均采用含有离子对试剂的流动相^[5,10-11],长期运行会对液相系统和色谱柱造成损害。本研究使用的流动相不需离子对试剂,结果显示各待测成分色谱峰峰形及理论板数良好。本研究考察了不同梯度洗脱程序、不同流速(0.5、0.8、1.0 mL/min)、不同进样体积(5、10、20 μ L)、不同柱温(25、30、35 $^{\circ}$ C)下对色谱分离效果的影响,结果显示,在最终确定的色谱条件下,4种成分的理论板数以维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆和维生素B₅计均大于9 400,待测成分峰间以及与样品中其他成分峰、辅料峰之间的分离度良好。

3.3 提取方法的选择

待测成分中硫酸双胍屈嗪在酸性水溶液中溶解度较好且较稳定,其他成分均在水中易溶。本研究比较了分别采用乙腈-0.2%磷酸溶液(1:4)、0.2%磷酸溶液、0.8%磷酸溶液作为提取溶剂对4种成分的影响,结果显示用0.8%磷酸溶液提取时,维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆、维生素B₅的回收率为98%~101%,而用乙腈-0.2%磷酸溶液(1:4)、0.2%磷酸溶液提取时4种成分的回收率分别为79%~83%、91%~95%,表明采用0.8%磷酸溶液可以将4种成分提取完全,故确定其为最终的提取溶剂。本研究比较了不同超声提取时间(25、45、60 min)对4种成分的影响,结果显示,超声时间为45、60 min时对各成分的提取率无明显差异,故确定45 min作为最终提取时间。本研究还比较了加提取溶剂将供试品溶液配制成不同质量浓度(约24、12、6 mg/mL)时对4种成分的影响,结果显示,溶液质量浓度约为24 mg/mL时各成分的响应值合适。

3.4 样品含量测定结果分析

测定的8批样品中,维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生

素B₆、维生素B₅含量分别为标示量的91.44%~98.74%、36.68%~95.23%、92.42%~97.90%、91.36%~99.48%,其中硫酸双胍屈嗪的含量差异较大,最低值与最高值间相差2.6倍。笔者经实地考察发现,目前市售的复方罗布麻片I均为山西云鹏制药有限公司与亚宝药业集团股份有限公司生产,因此本研究收集的样品具有一定的代表性。建议在今后标准修订时增加对维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆、维生素B₅的含量的规定,从而更有利于该药品的质量评价。

本研究的方法学验证参照国际通行的人用药品注册技术要求国际协调会议方法学验证原则^[12-13]进行,结果表明,建立的分析方法准确可靠、操作简便,可用于同时测定复方罗布麻片I中维生素B₁、硫酸双胍屈嗪、维生素B₆和维生素B₅的含量。

参考文献

- [1] 李平,赵洛沙,崔淑娴.复方罗布麻片对老年高血压患者动态血压的影响[J].中国老年学,2011,31(16):3153-3154.
- [2] 王淑华.硝苯地平联合复方罗布麻片治疗原发性高血压疗效观察[J].亚太传统医药,2011,7(1):56-57.
- [3] 韦晓.复方罗布麻片与卡托普利对老年高血压左室肥厚及舒张功能影响的比较[J].中国临床新医学,2014,7(2):138-140.
- [4] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第十一册[S].2002:235.
- [5] 吴红英,李道明.高效液相色谱法测定复方罗布麻片I中维生素B₆的含量[J].中国药师,2010,13(7):967-968.
- [6] 孙鲁江,王乃东.复方罗布麻片I中氢氯噻嗪的含量测定研究[J].中国实用医药,2012,7(31):246-247.
- [7] 黎昌权.复方罗布麻片中氢氯噻嗪含量均匀度考察[J].中国药师,2008,11(2):201-202.
- [8] 吴芳花,曾庆伟,黄玉昌,等.HPLC法测定复方罗布麻片I中盐酸异丙嗪的含量[J].中国药房,2013,24(36):3449-3451.
- [9] 朱叶青,王瑞生.高效液相色谱法测定复方罗布麻片I中盐酸异丙嗪含量[J].中国药业,2014,23(11):35-36.
- [10] 钱忠义.HPLC法测定复方罗布麻片I中3组分的含量[J].中国药师,2009,12(9):1265-1267.
- [11] 王玲娜,张晓璐,丁建.HPLC法对复方罗布麻片I中主要化学成分的检测[J].齐鲁药事,2011,30(2):83-85.
- [12] ICH-Q2A. Text on validation of analytical procedures[S]. 1995-03-01.
- [13] ICH-Q2B. Validation of analytical procedures: methodology[S]. 1996-11-06.

(收稿日期:2017-11-08 修回日期:2018-01-10)

(编辑:余庆华)