

HPLC-加校正因子的主成分自身对照法同时测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种有关物质含量^Δ

李浩贤^{1,2*}, 林华庆^{1#}, 李俊健², 王远见², 刘荣², 余楚钦¹(1.广东药科大学药学院/广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006; 2.广州玻思韬控释药业有限公司, 广州 510530)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0825-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.12

摘要 目的:建立同时测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种已知有关物质(奥美沙坦、奥美沙坦酯二聚体、奥美沙坦酯烯、苯并噻二嗪杂质,简称杂质A、B、C、D)的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)-加校正因子的主成分自身对照法进行测定。色谱柱为YMC-Triart C₈;流动相A为乙腈-0.015 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH至2.8)(70:30, V/V),流动相B为乙腈-0.015 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH至2.8)(15:85, V/V),梯度洗脱;流速为0.8 mL/min;检测波长为265 nm;柱温为25 ℃;自动进样器温度为4 ℃;进样量为10 μL。结果:杂质A、B、C、D的校正因子分别为1.42、1.17、0.89、0.92。奥美沙坦酯、氢氯噻嗪和杂质A、B、C、D的质量浓度线性范围分别为0.252 7~7.580 0、1.152 1~4.562 9、0.244 0~18.299 0、0.244 7~3.670 8、0.265 2~3.978 3、0.149 9~4.497 3 μg/mL(*r*均不低于0.999 7),检测限分别为0.084 2、0.050 7、0.081 3、0.081 6、0.088 4、0.050 0 μg/mL,定量限分别为0.252 7、0.152 1、0.244 0、0.244 7、0.265 2、0.149 9 μg/mL,中间精密度、稳定性(24 h)、重复性试验结果均符合相关要求,平均回收率分别为104.00%~108.04%、102.00%~104.94%、100.99%~106.89%、92.00%~95.18%、102.00%~105.06%、103.90%~107.00%(*n*=3)。3批奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中杂质A的含量为0.90%~1.00%,杂质B的含量为0~0.11%,杂质D的含量为0.16%~0.24%,杂质C及其余杂质未检出;所建立方法测得结果与外标法测得结果无明显差异。结论:本方法灵敏度高、重复性好,可用于奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种已知有关物质含量的同时测定。

关键词 奥美沙坦酯氢氯噻嗪片;有关物质;高效液相色谱法;加校正因子的主成分自身对照法

Simultaneous Determination of Four Related Substances in Olmesartan Medoxomil Hydrochlorothiazide Tablets by HPLC-Principal Component Self-Control with Correct Factor

LI Haoxian^{1,2}, LIN Huaqing¹, LI Junjian², WANG Yuanjian², LIU Rong², YU Chuqin¹(1.College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangzhou 510006, China; 2.Guangzhou Bostal Drug Delivery Co., Ltd., Guangzhou 510530, China)

- 用研究进展[J].中草药,2010,41(3):506-509.
- [4] 蒋秀蕾,范春林,叶文才.大蓟化学成分的研究[J].中草药,2006,37(4):510-512.
- [5] 顾玉斌,屠呦呦.大蓟化学成分的研究[J].中国中药杂志,1992,17(8):489-490,512.
- [6] 李敏,苗明三.大蓟的化学、药理及临床应用特点[J].中医学报,2016,31(2):262-265.
- [7] 陈海芳,陈凯云,袁金斌,等.大蓟的止血活性药效初步研究[J].中华中医药学刊,2010,28(7):1458-1459.
- [8] 石铸.中国菊科菜蓟族植物研究:三[J].植物研究,1984,4(2):59-66.
- [9] 吴蜀星,李治昊,宋良科,等.大蓟的基源调查与鉴定[J].现代中药研究与实践,2013,27(1):21-23.
- [10] 张丹,周洁.大蓟临床应用浅析[J].云南中医中药杂志,2004,25(3):19-21.
- [11] 伍敏生,曹维生,周启仲.大蓟药用部位成分分析[J].中医学报,2016,31(12):1947-1949.
- [12] 甄亚钦,冯玉,田伟,等.忍冬不同部位UPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2019,50(18):4449-4454.
- [13] 孙立丽,王萌,任晓亮.化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J].中草药,2017,48(20):4339-4345.
- [14] 邱新华,唐铁鑫,刘燕,等.几种模式识别方法用于中药挥发油红外光谱法鉴别的比较研究[J].中国药房,2015,26(21):2986-2988.
- [15] 龚千锋,钟凌云,张的风,等.大蓟饮片、大蓟炭的炮制及质量标准研究[C]//中华中医药学会第四届中药炮制分会学术会议论文集.北京:中华中医药学会中药炮制分会,2004:170-172.

Δ 基金项目:广东省科学技术厅-广东省中医药科学院联合科研项目(No.2016A020226038);广东省引进创新创业团队专项基金资助项目(No.2014ZT05Y018)

* 硕士研究生。研究方向:药物研发与转化。电话:020-39352512。E-mail:leo_salty@163.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药剂学。电话:020-39352518。E-mail:huaqing_@163.net

(收稿日期:2019-11-13 修回日期:2020-01-10)
(编辑:林静)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of four known related substances (olmesartan, olmesartan ester dimer, olmesartan ester alkene, benzothiadiazine impurity, called impurity A, B, C, D for short) in Olmesartan medoxomil hydrochlorothiazide tablets. METHODS: HPLC-principal component self-control with correction factor were adopted. The determination was performed on YMC-Triart C₈ column with mobile phase A consisted of acetonitrile-0.015 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH adjusted to 2.8 with phosphoric acid) (70:30, V/V), mobile phase B consisted of acetonitrile-0.015 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH adjusted to 2.8 with phosphoric acid) (15:85, V/V) at the flow rate of 0.8 mL/min (gradient elution). The detection wavelength was set at 265 nm, and column temperature was 25 °C. The temperature of injector was 4 °C; the injection volume was 10 μL. RESULTS: The correction factors of impurity A, B, C, D were 1.42, 1.17, 0.89, 0.92, respectively. The linear range of olmesartan medoxomil, hydrochlorothiazide and impurity A, B, C, D were 0.252 7-7.580 0, 1.152 1-4.562 9, 0.244 0-18.299 0, 0.244 7-3.670 8, 0.265 2-3.978 3 and 0.149 9-4.497 3 μg/mL ($r \geq 0.999 7$), respectively. The limits of detection were 0.084 2, 0.050 7, 0.081 3, 0.081 6, 0.088 4, 0.050 0 μg/mL, respectively. The quantitative limits were 0.252 7, 0.152 1, 0.244 0, 0.244 7, 0.265 2 and 0.149 9 μg/mL, respectively. The results of intermediate precision, stability (24 h) and repeatability tests all met the relevant requirements. The average recovery rates were 104.00%-108.04%, 102.00%-104.94%, 100.99%-106.89%, 92.00%-95.18%, 102.00%-105.06%, 103.90%-107.00% ($n=3$), respectively. The contents of impurity A, B and D in 3 batches of Olmesartan medoxomil hydrochlorothiazide tablets were 0.90%-1.00%, 0-0.11%, 0.16%-0.24%, respectively. The impurity C and other impurities were not detected. There is no significant difference between the results measured by the established method and by the external standard method. CONCLUSIONS: The method has been proved to be highly sensitive and reproducible. It can be used to simultaneously determine four known substances in Olmesartan medoxomil hydrochlorothiazide tablets.

KEYWORDS Olmesartan medoxomil hydrochlorothiazide tablets; Related substances; HPLC; Principal component self-control with correct factor

奥美沙坦酯氢氯噻嗪片作为治疗高血压的二线药物,于2010年在我国获批上市^[1],主要活性成分为奥美沙坦酯和氢氯噻嗪。奥美沙坦酯在胃肠道水解成活性成分奥美沙坦后发挥降压的作用^[2-3];氢氯噻嗪通过增加钠、钾、氯离子与水的排泄,从而减小血容量^[4],增强奥美沙坦酯的降压效果。在奥美沙坦酯氢氯噻嗪片的现行标准中(简称“标准”)明确提及,需对该制剂中4种已知有关物质奥美沙坦(简称“杂质A”)、奥美沙坦酯二聚体(简称“杂质B”)、奥美沙坦酯烯(简称“杂质C”)和苯并噻二嗪杂质A(简称“杂质D”)进行控制^[5]。其中,杂质A是奥美沙坦酯合成过程中的中间体残留,也可因奥美沙坦酯的酯键稳定性差而降解产生;杂质B与杂质C均为奥美沙坦酯的潜在降解杂质;杂质D是氢氯噻嗪的合成中间体,同时也是氢氯噻嗪不稳定的降解产物,其含量高会影响药品的稳定性和不良反应^[6-8]。

现行标准是采用高效液相色谱(HPLC)法测定该药中的有关物质,但该方法灵敏度与分离度相对较差^[5]。笔者查阅相关文献后发现,目前关于该复方制剂临床疗效的文献报道较多,但对其有关物质含量测定方法的文献报道较少,且其测定方法仍存在不足。比如,赵建峰^[1]虽然建立了该复方制剂的有关物质分析方法,但仅讨论了2种有关物质,也并未对有关物质的定量方法进行方法学验证,且采用外标法定量,成本较高。又如,常慧等^[9]虽采用超临界色谱与质谱联用法测定了该复方制剂中6种有关物质的含量,但所需仪器设备要求较高,难以普

及。加校正因子的主成分自身对照法,是以主成分作为对照的内标法,结合建立方法时测定的相对校正因子,能够准确测定已知有关物质的含量,可弥补现有研究的不足。因此,本研究拟建立HPLC-加校正因子的主成分自身对照法对奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种已知有关物质进行检测,提高该药品分析方法的灵敏度、可靠性,以期能更为科学、有效地控制该复方制剂中的有关物质含量,进一步加强该药品的质量控制。4种已知有关物质的结构式详见图1。

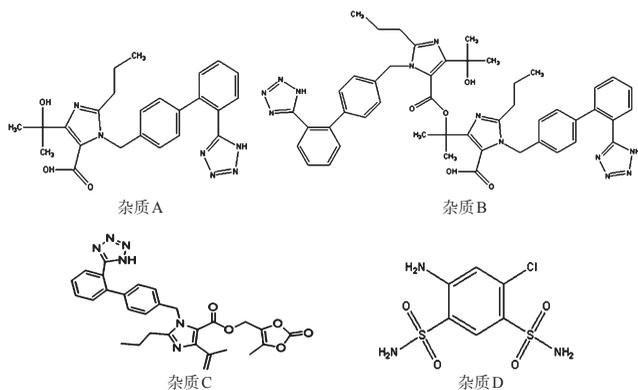


图1 4种已知有关物质的结构式

Fig 1 Structure diagrams of 4 known related substances

1 材料

1.1 仪器

XS204DU型万分之一电子天平、XS205DU型十万分之一电子天平、XP56型百万分之一电子天平、FE-28

型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器厂);LC2030C 型 HPLC 仪(日本岛津公司);VD23 型真空干燥箱(德国宾得公司);SHH-200GD-2 型光照箱(重庆永生实验仪器厂)。

1.2 药品与试剂

奥美沙坦酯氢氯噻嗪片(广州玻思韬控释药业有限公司,批号分别为 18OH029、18OH030、18OH041、18OH042,规格:含 40 mg 奥美沙坦酯、25 mg 氢氯噻嗪);奥美沙坦酯对照品(批号:WRS170601,纯度:99.9%)、杂质 A 对照品(批号:WRS170701,纯度:99.4%)、杂质 C 对照品(批号:IRS170701,纯度:94.0%)购自浙江天宇药业有限公司;氢氯噻嗪对照品(常州制药厂有限公司,批号:RS18002,纯度:99.5%);杂质 B 对照品(美国 Cato 公司,批号:90-12-2,纯度:98.4%);杂质 D 对照品(批号:JOL279,纯度:99%)、氯噻嗪对照品(批号:IOL188,纯度:99.6%)购自上海赫淳生物科技有限公司;5-氯氢氯噻嗪对照品(批号:2-ZAM-51-3,纯度:98%)、氢氯噻嗪二聚体对照品(批号:2-CGF-118-7,纯度:97.24%)购自加拿大 TRC 公司;乙腈(美国 BCR 公司,色谱纯);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Triart C₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相 A 为乙腈-0.015 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 2.8)(70:30, V/V),流动相 B 为乙腈-0.015 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 2.8)(15:85, V/V),梯度洗脱;流速:0.8 mL/min;检测器:光电二极管阵列检测器,检测波长:265 nm;柱温:25 ℃;自动进样器温度:4 ℃;进样量:10 μL。梯度洗脱程序详见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

| 时间,min | 流动相A,% | 流动相B,% |
|--------|--------|--------|
| 0 | 0 | 100 |
| 5 | 0 | 100 |
| 60 | 100 | 0 |
| 70 | 100 | 0 |
| 75 | 0 | 100 |
| 80 | 0 | 100 |

2.2 溶液的制备

2.2.1 主成分混合对照品溶液 取奥美沙坦酯对照品约 12.5 mg、氢氯噻嗪对照品约 7.5 mg,置于同一量瓶中,精密称定,加 70%乙腈溶解并制成奥美沙坦酯质量浓度为 0.05 mg/mL、氢氯噻嗪质量浓度为 0.03 mg/mL 的主成分混合对照品溶液。

2.2.2 杂质对照品溶液 称取杂质 A 对照品约 12 mg、

杂质 B 对照品约 2.4 mg、杂质 C 对照品约 5.6 mg、杂质 D 对照品约 6 mg,置于不同量瓶中,精密称定,分别用 70%乙腈制成质量浓度为 0.12 mg/mL 的杂质 A 对照品溶液、0.024 mg/mL 的杂质 B 对照品溶液、0.028 mg/mL 的杂质 C 对照品溶液以及 0.03 mg/mL 的杂质 D 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取 3 片奥美沙坦酯氢氯噻嗪片,置于 250 mL 量瓶中,加入 70%乙腈适量,待样品崩解分散后,超声(功率:250 W,频率:70 kHz)振摇 5 min,用 70%乙腈稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 尼龙滤膜滤过,弃去初滤液 5 mL,取续滤液,即得。

2.2.4 自身对照溶液 精密量取供试品溶液适量,用 70%乙腈稀释 100 倍,即得。

2.2.5 空白辅料溶液 按奥美沙坦酯氢氯噻嗪片制剂处方,称取各辅料适量(约相当于 3 片奥美沙坦酯氢氯噻嗪片所含辅料量),混匀,按“2.2.3”项下方法制备空白辅料溶液。

2.2.6 系统适用性溶液 取杂质 A 对照品 12 mg、杂质 B 对照品 2.4 mg、杂质 C 对照品 2.9 mg、奥美沙坦酯对照品 5 mg 和氢氯噻嗪、杂质 D、氯噻嗪、5-氯氢氯噻嗪、氢氯噻嗪二聚体对照品各 3 mg,置于同一量瓶中,用 70%乙腈稀释制成杂质 A、杂质 B、杂质 C、奥美沙坦酯质量浓度分别为 0.012、0.002 4、0.002 9、0.005 mg/mL 以及氢氯噻嗪、杂质 D、氯噻嗪、5-氯氢氯噻嗪、氢氯噻嗪二聚体质量浓度均为 0.003 mg/mL 的系统适用性溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2.5”项下的空白辅料溶液与“2.2.6”项下的系统适用性溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,空白辅料在各成分出峰处无干扰,主成分及各杂质峰间分离度均大于 2.0,理论板数按奥美沙坦酯和氢氯噻嗪计均大于 3 000,奥美沙坦酯、氢氯噻嗪和杂质 A、B、C、D 的保留时间分别为 39.60、13.14、25.80、42.52、44.73、9.99 min。可知,氢氯噻嗪、氯噻嗪、5-氯氢氯噻嗪、氢氯噻嗪二聚体这几个制剂中的已知杂质在未得到控制的情况下,也不会影响本研究中 4 种已知杂质的定量检测,本方法具有较好的系统适用性。系统适用性试验的色谱图详见图 2。

2.4 专属性试验

取同一批(批号:18OH029)奥美沙坦酯氢氯噻嗪片 20 片,研细,取 520 mg 细粉,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,平行称取 6 份。1 份不作处理,另外 5 份分别进行酸、碱、氧化、高温和光照破坏。(1)酸破坏:加入 0.01 mol/L 盐酸溶液 10 mL,室温放置 20 min;(2)碱破坏:加入 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,室温放置 15 min;(3)氧化破坏:加入 3%过氧化氢溶液 10 mL,室温放置 4 h;(4)高温破坏:将细粉放入 80 ℃烘箱中放置 24 h,取出,

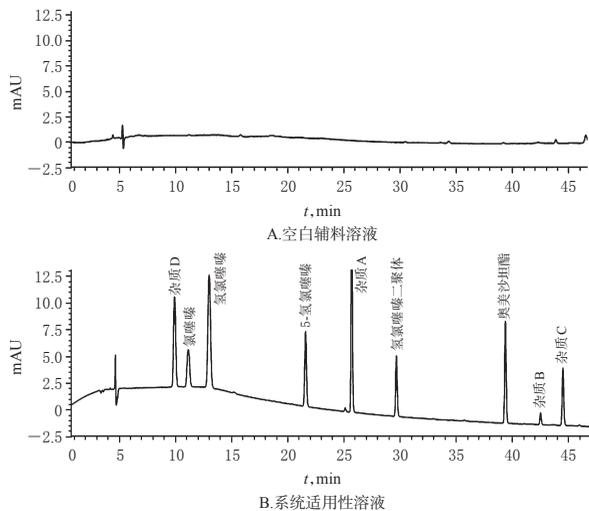


图2 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of system suitability test

冷却至室温；(5)光照破坏：将细粉置于光照箱中(5 000 lx)，24 h后取出。将上述6种样品(酸、碱破坏样品均经过中和)分别用70%乙腈稀释至刻度，摇匀，用0.45 μm滤膜滤过，弃去初滤液5 mL，取续滤液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，各破坏条件下辅料对本品中4种有关物质的检测均无干扰，供试品溶液中各成分峰均能有效分离；本品在光照条件下较稳定；在高温破坏条件下，本品中已知杂质含量无明显增长，但产生了2个未知杂质；在酸、碱、氧化破坏条件下，本品中已知杂质A、D的含量均明显增加，尤其是在酸、碱破坏条件下，杂质A、D的含量增加尤为明显，且均产生了1个未知杂质。专属性试验的色谱图详见图3。

2.5 线性关系考察

分别量取“2.2.1”“2.2.2”项下各对照品溶液适量，用70%乙腈分别制备成定量限浓度和相当于杂质限度20%、50%、100%、120%、150%的系列线性溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以对照品质量浓度为横坐标(x, μg/mL)、峰面积为纵坐标(y)绘制曲线，采用最小二乘法进行线性回归。以方程斜率(K)计算校正因子(f)： $f = K_{\text{主成分}} / K_{\text{杂质}}$ 。结果显示，奥美沙坦酯、氢氯噻嗪和杂质A、B、C、D的质量浓度线性范围分别为0.252 7~7.580 0、0.152 1~4.562 9、0.244 0~18.299 0、0.244 7~3.670 8、0.265 2~3.978 3、0.149 9~4.497 3 μg/mL。杂质A、B、C相对于奥美沙坦酯的校正因子分别为1.42、1.17、0.89，杂质D相对于氢氯噻嗪的校正因子为0.92。线性关系及校正因子考察结果详见表2。

2.6 检测限和定量限考察

分别取“2.2.1”“2.2.2”项下各对照品溶液适量，用逐步稀释法进行试验，当信噪比为3:1、10:1时分别得检测限和定量限。结果，奥美沙坦酯、氢氯噻嗪和杂质A、

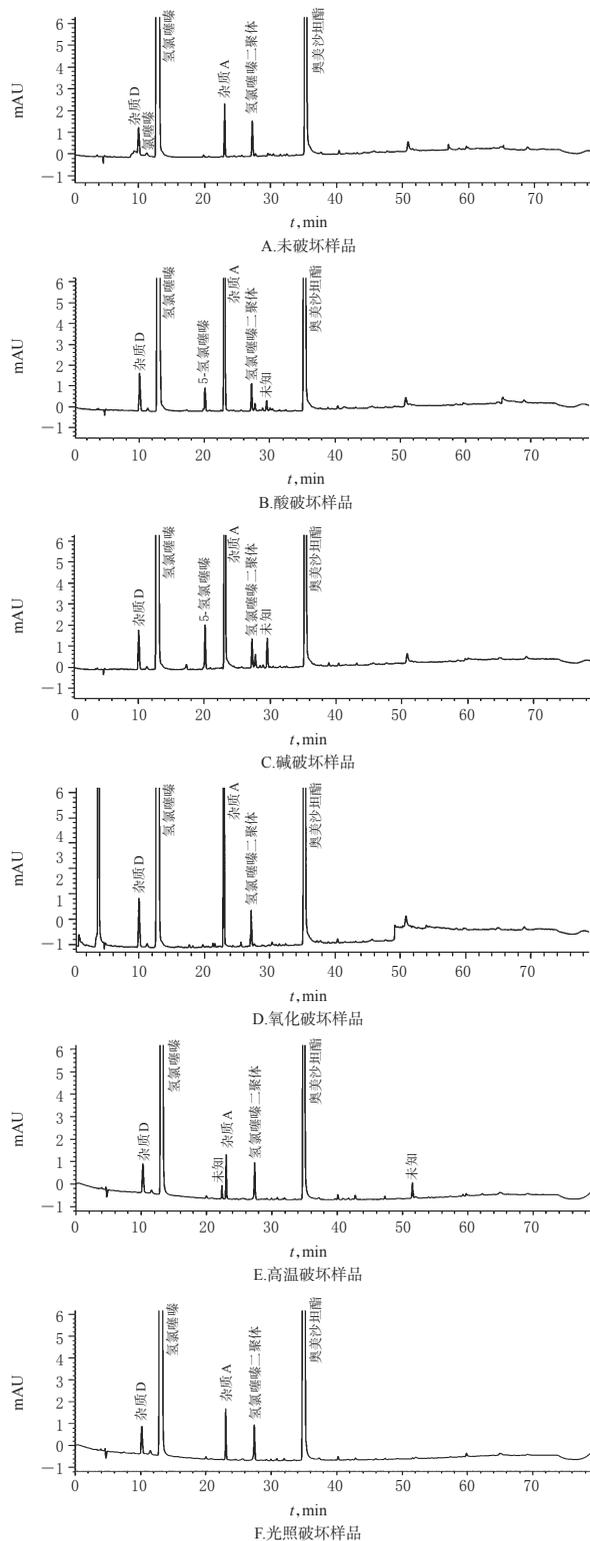


图3 专属性试验高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of specific test

B、C、D的检测限分别为0.084 2、0.050 7、0.081 3、0.081 6、0.088 4、0.050 0 μg/mL，定量限分别为0.252 7、0.152 1、0.244 0、0.244 7、0.265 2、0.149 9 μg/mL。

2.7 重复性试验

按“2.2.6”项下方法制备溶液，共6份，然后按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算各成分含

表2 线性关系及校正因子测定结果

Tab 2 Linear relations and correction factors determination results

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围, $\mu\text{g/mL}$ | f |
|-------|------------------------|---------|------------------------|------|
| 奥美沙坦酯 | $y=17\ 175.99x-425.98$ | 0.999 9 | 0.252 7~7.580 0 | |
| 氢氯噻嗪 | $y=37\ 368.41x-158.94$ | 0.999 9 | 0.152 1~4.562 9 | |
| 杂质A | $y=12\ 125.09x-544.57$ | 0.999 7 | 0.244 0~18.299 0 | 1.42 |
| 杂质B | $y=14\ 665.98x-423.70$ | 0.999 8 | 0.244 7~3.670 8 | 1.17 |
| 杂质C | $y=19\ 091.38x-333.01$ | 0.999 8 | 0.265 2~3.978 3 | 0.89 |
| 杂质D | $y=40\ 640.19x-96.95$ | 0.999 9 | 0.149 9~4.497 3 | 0.92 |

量。结果显示,奥美沙坦酯、氢氯噻嗪、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D含量的RSD分别为0.83%、1.21%、0.99%、1.42%、0.61%、1.04%($n=6$),表明该法重复性良好。

2.8 中间精密度试验

两位分析人员分别在不同时间(2 d)使用相同品牌、规格的不同色谱柱和HPLC仪进行操作。按“2.2.6”项下方法制备溶液,各6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,12份样品中各成分峰面积的RSD均小于2.00%($n=12$),表明该方法中间精密度良好。

2.9 回收率试验

按样品处方精密称取空白辅料适量,共9份,置于不同体积的量瓶中,分别加入“2.2.1”“2.2.2”项下溶液适量,用70%乙腈分别稀释为R1溶液(浓度相当于杂质限度的50%)、R2溶液(浓度相当于杂质限度的100%)和R3溶液(浓度相当于杂质限度的150%),各浓度溶液平行制备3份。分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算各成分的平均回收率。结果显示,R1、R2、R3溶液中各成分的平均回收率在92%~108%范围内,RSD均小于2.00%($n=3$),表明该方法准确度较好。回收率试验结果详见表3。

2.10 稳定性试验

取“2.9”项下回收率试验中R2溶液,分别于常温和6℃条件下放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,该溶液在室温下放置24 h时不稳定,杂质A和杂质B峰面积的RSD分别为5.2%、6.4%($n=6$),其余4种成分峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$);在6℃条件下,该溶液在24 h内稳定,6种成分峰面积的RSD均小于2.0%($n=6$)。

2.11 耐用性试验

取“2.9”项下回收率试验中R2溶液,在其他色谱条件不变的情况下,分别考察流动相B不同组成比例[乙腈-0.015 mol/L磷酸二氢钾溶液(13:87、15:85、17:83、 V/V)]、不同流速(0.6、0.8、1.0 mL/min)、不同柱温(20、25、30℃)对含量测定结果的影响,并计算各成分的回收率。结果,各种条件下系统适用性均符合要求,3种变化

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

| 成分 | 溶液 | 加入量, μg | 测得量, μg | 平均回收率, % | RSD, % |
|-------|----|--------------------|--------------------|----------|--------|
| 奥美沙坦酯 | R1 | 253.87 | 264.05 | 104.01 | 1.08 |
| | R2 | 505.33 | 525.54 | 104.00 | 1.89 |
| | R3 | 758.00 | 818.64 | 108.04 | 1.42 |
| 氢氯噻嗪 | R1 | 155.85 | 159.23 | 102.17 | 1.87 |
| | R2 | 304.19 | 310.27 | 102.00 | 0.63 |
| | R3 | 456.29 | 474.54 | 104.94 | 0.98 |
| 杂质A | R1 | 610.92 | 631.65 | 103.39 | 1.05 |
| | R2 | 1 219.94 | 1 232.14 | 100.99 | 1.52 |
| | R3 | 1 829.90 | 1 957.99 | 106.89 | 1.14 |
| 杂质B | R1 | 122.29 | 115.07 | 94.09 | 1.49 |
| | R2 | 244.72 | 225.14 | 92.00 | 1.11 |
| | R3 | 367.08 | 348.73 | 95.18 | 0.64 |
| 杂质C | R1 | 132.43 | 138.85 | 104.85 | 1.15 |
| | R2 | 265.22 | 270.52 | 102.00 | 1.28 |
| | R3 | 397.83 | 417.72 | 105.06 | 0.95 |
| 杂质D | R1 | 149.04 | 157.76 | 105.85 | 1.55 |
| | R2 | 299.82 | 311.81 | 103.90 | 0.55 |
| | R3 | 449.73 | 481.21 | 107.00 | 0.87 |

条件下(各平行2次)各成分回收率的RSD均小于2.00%($n=6$),表明该方法耐用性良好。耐用性试验结果详见表4。

表4 耐用性试验结果($n=6$)Tab 4 Results of durability tests($n=6$)

| 项目 | 回收率RSD, % | | | | | |
|------------|-----------|------|------|------|------|------|
| | 奥美沙坦酯 | 氢氯噻嗪 | 杂质A | 杂质B | 杂质C | 杂质D |
| 流动相B不同组成比例 | 1.50 | 1.14 | 1.84 | 0.62 | 1.20 | 1.25 |
| 不同流速 | 1.66 | 1.89 | 1.74 | 1.21 | 1.34 | 1.45 |
| 不同柱温 | 0.80 | 1.04 | 1.15 | 0.76 | 1.70 | 0.69 |

2.12 样品中4种有关物质含量测定

取3批样品(批号:18OH030、18OH041、18OH042),按“2.2.3”“2.2.4”项下方法制备供试品溶液和自身对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,并分别按加校正因子的主成分自身对照法与外标法计算各杂质的含量。每个样品平行2份,取均值。结果,按加校正因子的主成分自身对照法测得的3批样品中杂质A含量为0.90%~1.00%、杂质B含量为0.07%~0.11%(批号为18OH030的样品中未检出)、杂质D含量为0.16%~0.24%,杂质C及其他杂质未检出,与按外标法测得结果基本相同。奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种有关物质含量测定结果详见表5。

3 讨论

3.1 含量测定方法的考察

本研究利用标准曲线测定各杂质的校正因子,将样品供试品溶液稀释100倍后作为自身对照,采用加校正因子的主成分自身对照法^[10-13]计算4种有关物质含量,所得的结果与外标法所得结果相比无明显差异,表明相对校正因子的计算准确。将测得的相对校正因子载入

表5 奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种有关物质含量测定结果($n=2, \%$)

Tab 5 Results of 4 related substances contents in Olmesartan medoxomil hydrochlorothiazide tablets ($n=2, \%$)

| 批号 | 杂质A | | 杂质B | | 杂质C | | 杂质D | | 总杂质 | |
|---------|------|------|------|------|-----|----|------|------|------|------|
| | I | II | I | II | I | II | I | II | I | II |
| 18OH030 | 0.90 | 0.90 | - | - | - | - | 0.16 | 0.16 | 1.06 | 1.06 |
| 18OH041 | 1.00 | 1.00 | 0.11 | 0.10 | - | - | 0.24 | 0.23 | 1.35 | 1.33 |
| 18OH042 | 0.96 | 0.98 | 0.07 | 0.07 | - | - | 0.22 | 0.20 | 1.25 | 1.25 |

注：“I”为加校正因子的主成分自身对照法；“II”为外标法；“-”表示未检出

Note: “I” means principal component self-control with correction factor method; “II” means external standard method; “-” means indicates not detected

质量标准,可供常规检验使用,能降低因主成分与杂质的绝对校正因子不同引起的测定误差,且无需长期使用杂质对照品,可代替外标法准确测定已知有关物质的含量。同时,该法克服了面积归一化法中微量杂质与主成分可能不在同一线性范围内而造成的误差^[14],故能准确测定微量杂质含量。此外,对于未知杂质,由于无法获得对照品,考虑到其结构通常与主成分相似,其校正因子通常默认为1.00进行计算,故该法对未知杂质含量的计算存在一定误差。

3.2 色谱条件的考察

笔者在前期试验中主要考察了流速、检测波长和进样量对色谱分析的影响。(1)流速的考察:当选择流速为1.0 mL/min时,杂质B与杂质C的分离度仅为1.529,刚达到基线分离;当流速调整为0.8 mL/min时,两者的分离度提高至2.973,分离效果有明显改善,且各成分均有良好的峰形和分离度,故确定流速为0.8 mL/min。(2)检测波长的考察:标准中,该药有关物质检测的波长为250 nm^[5],但在试验过程中笔者发现,该波长下氢氯噻嗪响应值较低,影响了测定过程中对氢氯噻嗪色谱峰的处理与计算。笔者通过二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内扫描,并参考本课题组前期建立的该药主成分含量测定方法,选定检测波长为265 nm。在该检测波长下,氢氯噻嗪与奥美沙坦酯的响应值相当,且各成分均有较好的响应值。(3)进样量的考察:笔者比较了5、10、20 μ L进样量对色谱分离情况的影响。结果显示,以5 μ L为进样量时,分离度良好,但主峰的峰高过低,定量限溶液的信噪比低于10,难以准确定量;以20 μ L为进样量时,分离度有所下降,且检出杂质过多,不利于对主要成分和已知杂质进行分析;而以10 μ L为进样量时,各成分均能达到较好的分离和检验结果。

综上所述,本研究建立了HPLC-加校正因子的主成

分自身对照法用于测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中4种已知有关物质的含量。方法学验证结果表明,该方法操作简便、专属性好、灵敏度高、定量准确,能同时测定该复方制剂中4种已知有关物质的含量,可为该药的质量控制与评价提供一定的参考依据。

参考文献

- [1] 赵建峰. HPLC法测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片含量和有关物质[J]. 中国执业药师, 2012, 9(7): 23-25.
- [2] 栾保磊, 徐新军, 梁桂挺, 等. HPLC-MS测定奥美沙坦酯中有关基因毒性杂质[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(3): 325-329.
- [3] 范振兴. 奥美沙坦酯药物经济学研究的系统评价[J]. 中国药房, 2016, 27(8): 1017-1019.
- [4] 于刚. 美托洛尔联合复方氢氯噻嗪治疗老年重症心力衰竭效果探讨[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(17): 67-68.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 奥美沙坦酯氢氯噻嗪片 YBH01102010[S]. 2010.
- [6] 王焕, 王国振. 氢氯噻嗪片中有关物质苯并噻二嗪杂质的研究[J]. 河北医药, 2012, 34(16): 2519-2521.
- [7] 李亚萍, 王静, 周立新, 等. HPLC法测定氨氯地平氢氯噻嗪缬沙坦片中的有关物质[J]. 中国药房, 2017, 28(12): 1714-1717.
- [8] DINC E. Three-way analysis of the UPLC-PDA dataset for the multicomponent quantitation of hydrochlorothiazide and olmesartan medoxomil in tablets by parallel factor analysis and three-way partial least squares[J]. *Talanta*, 2016, 148(2): 144-152.
- [9] 常慧, 张天虹. SFC/MS/MS法测定奥美沙坦酯氢氯噻嗪片中有关物质的含量[C]//《中国药学杂志》京津杯第十二届全国药物分析优秀论文评选交流会暨第二届药物分析国际论坛论文集. 沈阳: 中国药学会, 2015: 278-279.
- [10] 郭青, 刘莉, 周自桂. HPLC-加校正因子的主成分自身对照法同时测定琥珀酸索利那新原料药中7种有关物质[J]. 中国药房, 2019, 30(11): 1481-1486.
- [11] 梁静, 黄俊, 徐登. 加校正因子自身对照法同时测定富马酸替诺福韦二吡啶酯13个已知杂质[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(4): 423-431.
- [12] 周燕丽, 余永华, 马佳丽, 等. HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(5): 627-631.
- [13] 鹿贵花, 杨梅, 胡丽娜. 加校正因子的主成分自身对照法同时测定咪喹莫特5个杂质[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1320-1328.
- [14] 张启明, 李慧义. 色谱分析中面积归一化法测定有关物质的弊与利[J]. 中国药品标准, 2005, 6(4): 45-46.

(收稿日期: 2019-10-23 修回日期: 2020-02-05)

(编辑: 林 静)