

## 标准研讨

高效液相色谱双波长法测定复方罗布麻片 I 中 6 个组分的含量<sup>\*</sup>刘倩倩<sup>1</sup>, 谢子立<sup>2\*\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

**摘要** 目的: 建立 HPLC 法同时测定复方罗布麻片 I 中泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈嗪及盐酸异丙嗪的含量。方法: 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.10% 辛烷磺酸钠 + 0.40% 磷酸二氢钾 (磷酸调 pH 至 3.0) - 乙腈 (96:4), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 泛酸钙 200 nm, 氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、硫酸双胍屈嗪、维生素 B<sub>1</sub> 及盐酸异丙嗪均为 271 nm; 柱温 30 °C; 进样量 40 μL。结果: 泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈嗪及盐酸异丙嗪的线性范围分别为 1.335~13.35 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 9)、7.827~78.27 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000 0)、2.546~25.46 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000)、2.522~25.22 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.999 9)、8.229~82.29 μg · mL<sup>-1</sup> (r=0.997 6) 和 5.264~52.64 μg · mL<sup>-1</sup> (r=1.000); 平均回收率 (RSD) 分别为 100.9% (1.1%)、101.6% (0.60%)、100.5% (0.87%)、100.0% (1.1%)、100.3% (0.99%) 和 100.4% (0.75%); 测定样品 3 批, 上述 6 个成分的测定结果分别为标示量的 98.38%~110.97%、101.08%~102.56%、96.58%~100.98%、100.50%~106.41%、41.48%~55.75% 和 88.88%~92.33%。结论: 本法经方法学验证, 可用于复方罗布麻片 I 的质量控制。

**关键词:** 复方罗布麻片 I; 含量测定; 泛酸钙; 氢氯噻嗪; 维生素 B<sub>6</sub>; 维生素 B<sub>1</sub>; 硫酸双胍屈嗪; 盐酸异丙嗪

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 09-1593-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.09.18

Determination of the contents of six components in compound kendir leaf tablets I by dual wavelengths of HPLC<sup>\*</sup>LIU Qian-qian<sup>1</sup>, XIE Zi-li<sup>2\*\*</sup>

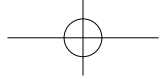
(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of calcium pantothenate, hydrochlorothiazide, pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride, sulfhydryl sulfate and promethazine hydrochloride in the compound kendir leaf tablets I. **Method:** A Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted in the study. The mobile phase A consisted of 0.10% octane sulfonic acid sodium and

<sup>\*</sup> 重大科学仪器设备开发专项 (2013YQ220643)<sup>\*\*</sup> 通信作者 Tel: (0551) 63358051; E-mail: 1536838165@qq.com

第一作者 Tel: 18096642043; E-mail: 1137026954@qq.com



0.40% potassium dihydrogen phosphate (adjust pH to 3.0 with phosphoric acid)–acetonitrile (96:4). The mobile phase B was acetonitrile with gradient elution at a flow rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Dual detection wavelength was applied. Calcium pantothenate was 200 nm; hydrochlorothiazide, pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride, dihydralazine sulfate and promethazine hydrochloride was 271 nm. The column temperature was controlled at  $30^\circ\text{C}$  and the injection volume was  $40 \mu\text{L}$ . **Results:** The linear ranges of calcium pantothenate, hydrochlorothiazide, pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride, sulphydrazine sulfate and promethazine hydrochloride were  $1.335\text{--}13.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9999$ ),  $7.827\text{--}78.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=1.000$ ),  $2.546\text{--}25.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=1.000$ ),  $2.522\text{--}25.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9999$ ),  $8.229\text{--}82.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=0.9976$ ) and  $5.264\text{--}52.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r=1.000$ ) respectively. The average recovery ranges of six components were 100.9% (RSD=1.1%), 101.6% (0.60%), 100.5% (0.87%), 100.0% (1.1%), 100.3% (0.99%) and 100.4% (0.75%). Three batches of samples were determined. Six components of the measurement results were measured: 98.38%–110.97%, 101.08%–102.56%, 96.58%–100.98%, 100.50%–106.41%, 41.48%–55.75% and 88.88%–92.33%, respectively. **Conclusions:** This method is verified by methodology and it can be used for quality control of the compound kendir leaf tablets I.

**Keywords:** compound kendir leaves tablets I; content determination; calcium pantothenate; hydrochlorothiazide; vitamin B<sub>6</sub>; vitamin B<sub>1</sub>; dihydralazine sulfate and; promethazine hydrochloride

复方罗布麻片 I 是由罗布麻叶、野菊花、防己、氢氯噻嗪、硫酸双肼屈嗪以及盐酸异丙嗪等<sup>[1]</sup> 11 味中西药组成的复方制剂,药效协同<sup>[2-3]</sup>,成分复杂<sup>[4]</sup>,常用于治疗高血压,临床应用多年,疗效明显。现行标准为《国家药品标准》化学药品地方标准上升国家标准第十一册,现行标准只收录了氢氯噻嗪<sup>[5-8]</sup>的含量测定和盐酸异丙嗪的薄层鉴别。氢氯噻嗪作为高效的降压药<sup>[9]</sup>,是作用于远曲小管的利尿剂<sup>[10]</sup>,通过排钠利尿,造成体内 Na<sup>+</sup> 和水的负平衡,使细胞外液和血容量减少而降压。为了提高其降压效果,有些复合剂型中会加入一些低效的抗高血压药,如硫酸双肼屈嗪,从而提高疗效,因此复方罗布麻片 I 的质量标准提高迫在眉睫。通过大量的实验摸索,并结合正交验证实验,用 Spss 17.0 软件对数据进行分析,从而得出最佳色谱系统,便于控制该药的质量标准,也为控制复方罗布麻片 I 的内在质量研究提供了科学依据。

## 1 仪器与试药

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪, LC-20AD 紫外可见光度检测器, Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); Elmasonic P 超声仪; XS-105 十万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器); BINDER 电热干燥箱 (BINDER)。

对照品 泛酸钙 (批号: 100370-201402, 纯度为 97.5%)、氢氯噻嗪 (批号: 100309-201103, 纯度为

99.8%)、维生素 B<sub>6</sub> (批号: 100116-201103)、维生素 B<sub>1</sub> (批号: 100390-200502)、硫酸双肼屈嗪 (批号: 100514-201102, 纯度为 85.5%) 和盐酸异丙嗪 (批号: 100422-201002, 纯度为 99.4%) 均来自中国食品药品检定研究院,供含量测定用,复方罗布麻片 I 由东芝堂药业 (安徽) 有限公司提供,批号分别为 151001、151002 和 151003。乙腈、甲醇均为色谱纯,辛烷磺酸钠为离子对色谱用试剂,水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

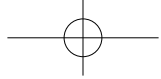
## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为 0.10% 辛烷磺酸钠 + 0.40% 磷酸二氢钾 (磷酸调 pH 至 3.0)–乙腈 (96:4), 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (0~12 min, 99%A; 12~15 min, 99%A → 96%A; 15~30 min, 96%A; 30~33 min, 96%A → 90%A; 33~105 min, 90%A; 105~108 min, 90%A → 65%A; 108~130 min, 65%A; 130~135 min, 65%A → 99%A; 135~155 min, 99%A); 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 检测波长: 泛酸钙 200 nm, 氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、硫酸双肼屈嗪、维生素 B<sub>1</sub> 及盐酸异丙嗪均为 271 nm; 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样体积:  $40 \mu\text{L}$ 。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品储备液** 分别精密称取泛酸钙、氢氯噻



噻、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈噻和盐酸异丙噻的对照品适量,加 0.8% 磷酸-乙腈(80:20)混合溶液使溶解并稀释制成每 1 mL 含 0.133 5、0.782 7、0.254 6、0.252 2、0.822 9、0.526 4 mg 的混合溶液,作为对照品储备液。

**2.2.2 对照品溶液** 精密量取“2.2.1”项下的对照品储备液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,加 0.8% 磷酸-乙腈(80:20)混合溶液 50 mL,用流动相 A 稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

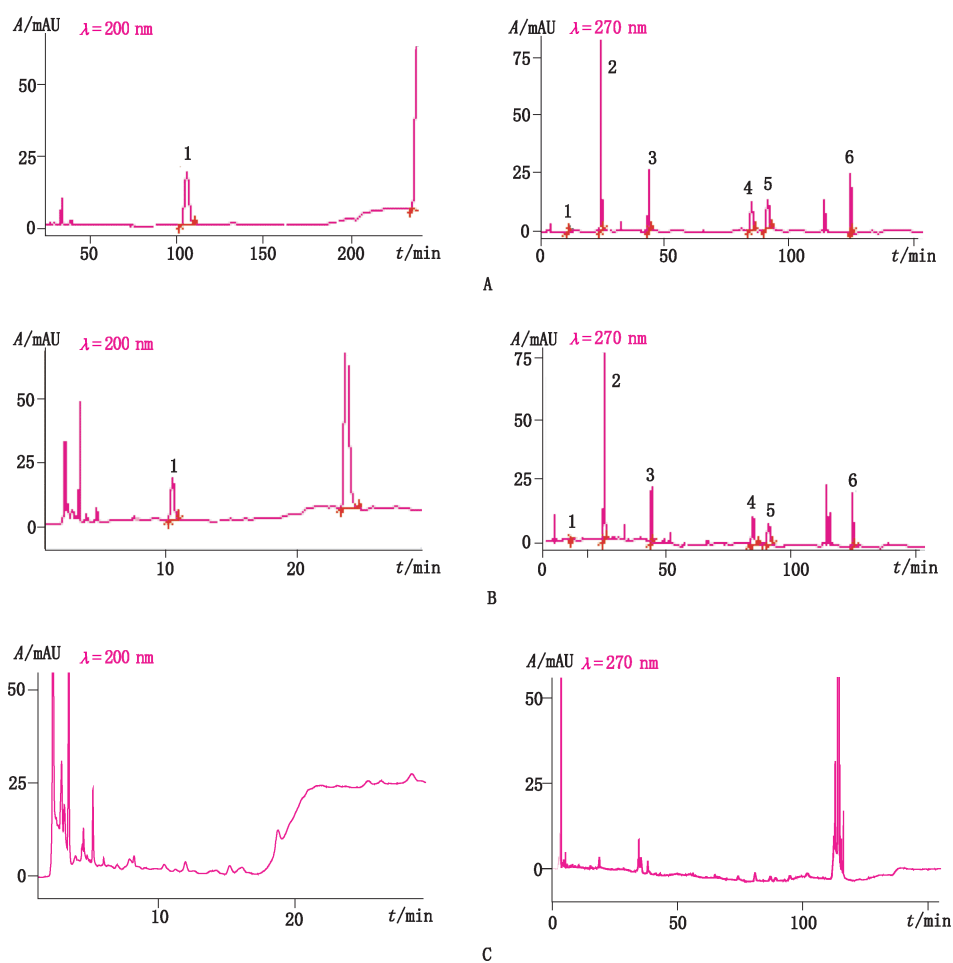
**2.2.3 供试品溶液** 取本品 20 片,精密称定,精密称取适量(约相当于氢氯噻嗪 4.0 mg)置 100 mL 量瓶中,加 0.8% 磷酸-乙腈(80:20)混合溶液 50 mL,

超声(功率 1 kW,频率 60 Hz)20 min 使溶解,放至室温,用流动相 A 稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

**2.2.4 阴性对照溶液** 按处方比例制备不含泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈噻及盐酸异丙噻的溶液,按“2.2.3”项下方法处理,作为阴性对照溶液。

### 2.3 专属性试验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别进样 40  $\mu$ L,在色谱图中,混合对照品及供试品出峰位置,阴性对照溶液无干扰,色谱图如图 1。



1. 泛酸钙 (calcium pantothenate) 2. 氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide) 3. 维生素 B<sub>6</sub> (pyridoxine hydrochloride) 4. 维生素 B<sub>1</sub> (thiamine hydrochloride) 5. 硫酸双胍屈噻 (sulfhydryazine sulfate) 6. 盐酸异丙噻 (promethazine hydrochloride)

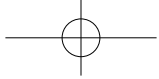
图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 及阴性供试品 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), samples (B) and negative samples (C)

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下的对照品储备液各 1、3、5、7、10 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加 0.8% 磷

酸-乙腈(80:20)混合溶液约 50 mL,摇匀,分别用流动相 A 稀释至刻度,即得系列线性溶液,按“2.1”项下色谱条件,以对照品的峰面积  $Y$  为纵坐标、质量



浓度  $X$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标, 进行线性回归, 线性方程、 $r$  值和线性范围见表 1。以信噪比 ( $S/N$ ) 为 3:1 和 10:1 为基准测得各成分的检测下限和定量下限, 结果见表 1。

表 1 各被测成分的标准曲线方程、相关系数、线性范围和检测下限及定量下限 ( $n=6$ )

Tab. 1 Regressive equations, correlation coefficients, linear ranges of the investigated components and LOQ, LOD

| 成分<br>(component)                             | 回归方程<br>(regression equation)             | $r$     | 线性范围<br>(linear range) / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 定量下限<br>(LOQ) / $\mu\text{g}$ | 检测下限<br>(LOD) / $\mu\text{g}$ |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 泛酸钙 (calcium pantothenate)                    | $Y=5.000 \times 10^7 X-456.9$             | 0.999 9 | 1.335~13.35                                                     | 3.338                         | 1.068                         |
| 氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide)                    | $Y=2.000 \times 10^8 X+8.618 \times 10^3$ | 1.000   | 7.827~78.27                                                     | 0.122                         | 0.037                         |
| 维生素 B <sub>6</sub> (pyridoxine hydrochloride) | $Y=4.000 \times 10^7 X+357.3$             | 1.000   | 2.546~25.46                                                     | 0.509                         | 0.141                         |
| 维生素 B <sub>1</sub> (thiamine hydrochloride)   | $Y=2.000 \times 10^7 X-6.582 \times 10^3$ | 0.999 9 | 2.522~25.22                                                     | 1.261                         | 0.360                         |
| 硫酸双胍屈嗪 (dihydralazine sulfate)                | $Y=6.000 \times 10^7 X-2.063 \times 10^3$ | 0.997 6 | 8.229~82.29                                                     | 5.878                         | 1.829                         |
| 盐酸异丙嗪 (promethazine hydrochloride)            | $Y=2.000 \times 10^7 X+1.382$             | 1.000   | 5.264~52.64                                                     | 1.053                         | 0.292                         |

## 2.5 精密度试验

吸取“2.2.2”项下的对照品溶液 40  $\mu\text{L}$ , 按照“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积并计算 RSD, 结果泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈嗪和盐酸异丙嗪峰面积的 RSD ( $n=6$ ) 分别为 0.27%、0.09%、0.11%、0.47%、1.0% 和 0.13%, 表明仪器精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

取“2.2.3”项下同一供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、12、18 h 按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈嗪和盐酸异丙嗪峰面积的 RSD ( $n=6$ ) 分别为 1.2%、0.09%、1.2%、1.5%、1.6% 和 0.43%, 表明供试品溶液在 18 h 内稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

取同一批供试品 (批号 151003), 按照“2.2.3”项下平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双胍屈嗪和盐酸异丙嗪含量百分比 ( $n=6$ ) 分别为 97.57%、101.18%、97.71%、100.86%、48.61% 和 89.19%, RSD 分别为 1.5%、0.54%、0.60%、1.2%、1.7% 和 0.57%, 表明该方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品, 约相当于 2.5 片的量, 置 200 mL 量瓶中, 共 9 份, 平均分为 3 组, 分别精密加入对照品储备液 4、5 和 6 mL, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 结果见表 2。

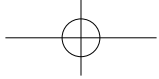
表 2 加样回收率实验结果 ( $n=6$ )

Tab. 2 Recoveries of six compounds

| 成分<br>(component)             | 已知量<br>(content) / mg | 加入量<br>(added content) / mg | 测得量<br>(detected content) / mg | 回收率<br>(recovery) / % | 平均回收率<br>(average recovery) / % | RSD / % |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------|
| 泛酸钙<br>(calcium pantothenate) | 0.68                  | 0.49                        | 1.19                           | 102.4                 | 100.9                           | 1.1     |
|                               | 0.67                  | 0.49                        | 1.16                           | 100.3                 |                                 |         |
|                               | 0.68                  | 0.49                        | 1.17                           | 100.7                 |                                 |         |
|                               | 0.67                  | 0.62                        | 1.28                           | 99.2                  |                                 |         |
|                               | 0.68                  | 0.62                        | 1.29                           | 99.7                  |                                 |         |
|                               | 0.68                  | 0.62                        | 1.31                           | 101.6                 |                                 |         |
|                               | 0.68                  | 0.74                        | 1.43                           | 102.0                 |                                 |         |
|                               | 0.68                  | 0.74                        | 1.43                           | 101.4                 |                                 |         |
|                               | 0.67                  | 0.74                        | 1.42                           | 100.8                 |                                 |         |

表 2(续)

| 成分<br>( component )                                | 已知量<br>( content )/mg | 加入量<br>( added content )/mg | 测得量<br>( detected content )/mg | 回收率<br>( recovery )/% | 平均回收率<br>( average recovery )/% | RSD/% |
|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-------|
| 氢氯噻嗪<br>( hydrochlorothiazide )                    | 4.02                  | 3.12                        | 7.16                           | 100.6                 | 101.6                           | 0.60  |
|                                                    | 4.12                  | 3.12                        | 7.27                           | 100.8                 |                                 |       |
|                                                    | 4.21                  | 3.12                        | 7.38                           | 101.4                 |                                 |       |
|                                                    | 4.18                  | 3.91                        | 8.18                           | 102.3                 |                                 |       |
|                                                    | 4.10                  | 3.91                        | 8.09                           | 102.3                 |                                 |       |
|                                                    | 4.08                  | 3.91                        | 8.04                           | 101.4                 |                                 |       |
|                                                    | 4.14                  | 4.69                        | 8.91                           | 101.8                 |                                 |       |
|                                                    | 4.14                  | 4.69                        | 8.90                           | 101.5                 |                                 |       |
|                                                    | 4.10                  | 4.69                        | 8.88                           | 101.9                 |                                 |       |
| 维生素 B <sub>6</sub><br>( pyridoxine hydrochloride ) | 1.21                  | 1.02                        | 2.22                           | 98.8                  | 100.5                           | 0.87  |
|                                                    | 1.24                  | 1.02                        | 2.25                           | 99.5                  |                                 |       |
|                                                    | 1.27                  | 1.02                        | 2.29                           | 100.8                 |                                 |       |
|                                                    | 1.26                  | 1.27                        | 2.53                           | 100.1                 |                                 |       |
|                                                    | 1.23                  | 1.27                        | 2.52                           | 101.2                 |                                 |       |
|                                                    | 1.23                  | 1.27                        | 2.52                           | 101.3                 |                                 |       |
|                                                    | 1.25                  | 1.53                        | 2.79                           | 101.2                 |                                 |       |
|                                                    | 1.25                  | 1.53                        | 2.79                           | 101.0                 |                                 |       |
|                                                    | 1.24                  | 1.53                        | 2.77                           | 100.4                 |                                 |       |
| 维生素 B <sub>1</sub><br>( thiamine hydrochloride )   | 1.25                  | 1.00                        | 2.26                           | 100.2                 | 100.0                           | 1.1   |
|                                                    | 1.29                  | 1.00                        | 2.31                           | 101.8                 |                                 |       |
|                                                    | 1.31                  | 1.00                        | 2.32                           | 100.4                 |                                 |       |
|                                                    | 1.30                  | 1.26                        | 2.54                           | 98.2                  |                                 |       |
|                                                    | 1.28                  | 1.26                        | 2.52                           | 98.6                  |                                 |       |
|                                                    | 1.27                  | 1.26                        | 2.54                           | 100.5                 |                                 |       |
|                                                    | 1.29                  | 1.51                        | 2.81                           | 100.7                 |                                 |       |
|                                                    | 1.29                  | 1.51                        | 2.81                           | 100.3                 |                                 |       |
|                                                    | 1.27                  | 1.51                        | 2.79                           | 99.6                  |                                 |       |
| 硫酸双胍屈嗪<br>( dihydralazine sulfate )                | 1.65                  | 2.81                        | 4.48                           | 100.8                 | 100.3                           | 0.99  |
|                                                    | 1.69                  | 2.81                        | 4.51                           | 100.2                 |                                 |       |
|                                                    | 1.72                  | 2.81                        | 4.53                           | 99.8                  |                                 |       |
|                                                    | 1.71                  | 3.51                        | 5.21                           | 99.5                  |                                 |       |
|                                                    | 1.68                  | 3.51                        | 5.19                           | 99.9                  |                                 |       |
|                                                    | 1.67                  | 3.51                        | 5.17                           | 99.6                  |                                 |       |
|                                                    | 1.69                  | 4.22                        | 5.87                           | 99.0                  |                                 |       |
|                                                    | 1.69                  | 4.22                        | 5.99                           | 101.8                 |                                 |       |
|                                                    | 1.68                  | 4.22                        | 5.98                           | 101.8                 |                                 |       |
| 盐酸异丙嗪<br>( promethazine hydrochloride )            | 2.32                  | 2.09                        | 4.40                           | 99.4                  | 100.4                           | 0.75  |
|                                                    | 2.38                  | 2.09                        | 4.46                           | 99.4                  |                                 |       |
|                                                    | 2.43                  | 2.09                        | 4.51                           | 99.4                  |                                 |       |
|                                                    | 2.41                  | 2.62                        | 5.05                           | 100.9                 |                                 |       |
|                                                    | 2.37                  | 2.62                        | 5.01                           | 100.9                 |                                 |       |
|                                                    | 2.36                  | 2.62                        | 5.01                           | 101.4                 |                                 |       |
|                                                    | 2.39                  | 3.14                        | 5.54                           | 100.4                 |                                 |       |
|                                                    | 2.39                  | 3.14                        | 5.56                           | 100.8                 |                                 |       |
|                                                    | 2.37                  | 3.14                        | 5.53                           | 100.5                 |                                 |       |



## 2.9 样品含量测定

分别取不同厂家的样品,按“2.2.3”项下方法制

备供试品溶液,再按“2.1”项下的色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量,结果见表3。

表3 复方罗布麻片I中6个成分的标示量含量(%)

Tab. 3 Contents of six components in kendir leaves tablets I to labelled amount

| 批号<br>(lot No.) | 泛酸钙<br>(calcium<br>pantothenate) | 氢氯噻嗪<br>(hydrochlor-<br>othiazide) | 维生素B <sub>6</sub><br>(pyridoxine<br>hydrochloride) | 维生素B <sub>1</sub><br>(thiamine<br>hydrochloride) | 硫酸双胍屈嗪<br>(dihydralazine<br>sulfate) | 盐酸异丙嗪<br>(promethazine<br>hydrochloride) |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 151001          | 98.38                            | 101.08                             | 96.58                                              | 100.50                                           | 41.48                                | 88.88                                    |
| 151002          | 110.97                           | 101.84                             | 99.87                                              | 105.86                                           | 55.75                                | 91.36                                    |
| 151003          | 107.32                           | 102.56                             | 100.98                                             | 106.41                                           | 52.42                                | 92.33                                    |

## 3 讨论

### 3.1 流动相 pH 及色谱柱的选择

本次研究显示流动相 pH 偏酸性,各化学成分具有较好的稳定性和峰形。考虑不同色谱柱的填料在分离效果上存在一定差异,选择3种不同品牌的色谱柱进行比较,型号均为250 mm×4.6 mm,5 μm,见表4。本文运用 Spss 17.0 软件对实验结果进行方差分析<sup>[11]</sup>,得到表5,以分离度为优化指标。由表5可知,因子A 栏  $P=0.004$ ,在显著水平  $\alpha=0.05$  上有统计学意义;因子B 栏  $P=0.030$ ,在显著水平  $\alpha=0.05$  上有统计学意义。也就是说因子A 和因子B 在显著水平  $\alpha=0.05$  上显著。由表6可见,A<sub>2</sub>B<sub>1</sub> 为最佳条件,即 pH 为3.0,色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub>。

表4 正交实验的因素及水平

Tab. 4 Factors and levels of orthogonal test

| 因子<br>(factor)                        | 水平一<br>(level 1) | 水平二<br>(level 2) | 水平三<br>(level 3) |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| A (pH)                                | 2.8              | 3.0              | 3.2              |
| B [ 色谱柱<br>(chromatographic column) ] | Kromasil         | Agilent          | Phenomenex       |

### 3.2 溶剂的选择

参照2015年版《中华人民共和国药典》及相关文献<sup>[12-13]</sup>,待测组分中除氢氯噻嗪和硫酸双胍屈嗪外,其余组分均在水中易溶。由于硫酸双胍屈嗪在酸性水溶液中溶解度较好且较稳定,实验分别考察了硫酸双胍屈嗪在0.6%、0.8%和1.0%的冰醋酸溶液以及0.6%、0.8%和1.0%的磷酸溶液中溶解及稳定性,结果显示0.8%的磷酸溶液最佳。由于氢氯噻嗪在乙腈中溶解度较好<sup>[14]</sup>,笔者以0.8%磷酸溶液-乙腈不同比例约50 mL混合溶液(比例范围5:45~45:5)分

表5 主体间效应的检验

Tab. 5 The test of inter-subjective effects

| 源 (source)                  | Ⅲ型平方和<br>(sum of squares<br>of Ⅲ type) | df | 均方<br>(mean<br>square) | 临界值<br>(F) | 显著性<br>(Sig.) |
|-----------------------------|----------------------------------------|----|------------------------|------------|---------------|
| 校正模型<br>(correction model)  | 3.483 <sup>a</sup>                     | 4  | 0.871                  | 19.132     | 0.007         |
| 截距 (intercept)              | 88.680                                 | 1  | 88.680                 | 1 948.252  | 0.000         |
| A                           | 2.609                                  | 2  | 1.304                  | 28.656     | 0.004         |
| B                           | 0.875                                  | 2  | 0.437                  | 9.607      | 0.030         |
| 误差 (error)                  | 0.182                                  | 4  | 0.046                  |            |               |
| 总计 (sum)                    | 92.345                                 | 9  |                        |            |               |
| 校正的总计<br>(corrected totals) | 3.665                                  | 8  |                        |            |               |

因变量 (dependent variable): 分离度 (resolution)

a. R 方 =0.950 (调整 R 方 =0.901) (the adjustment of R=0.901)

表6 A×B 正交表

Tab. 6 A×B orthogonal table

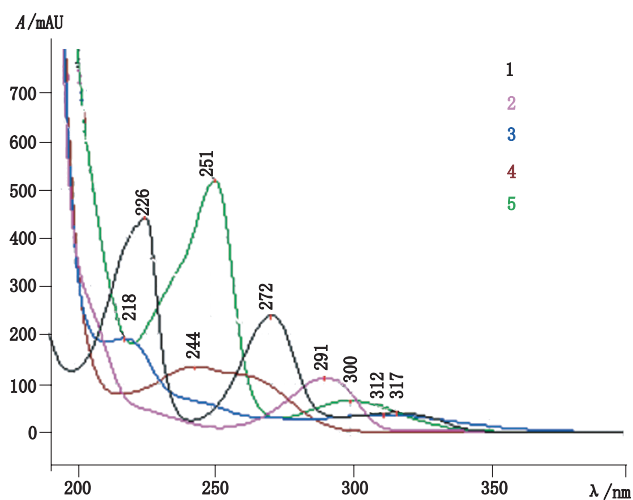
| 色谱柱<br>(chromatographic column) | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| B <sub>1</sub>                  | 3.454          | 4.363          | 2.918          |
| B <sub>2</sub>                  | 1.365          | 1.512          | 1.170          |
| B <sub>3</sub>                  | 1.978          | 1.869          | 1.215          |

别作为溶剂,考察拟定样品称样量中相关组分溶解情况,并用流动相A 稀释至100 mL,在同一色谱条件进样测定,结果0.8%磷酸溶液-乙腈(40:10)的混合溶液能确保样品溶解完全且溶液稳定。

### 3.3 波长的选择

泛酸钙在230 nm 以上无紫外发色基团,通过测定泛酸钙的紫外吸收光谱,发现其最大吸收在195 nm。文献报道泛酸钙的检测波长多在210 nm<sup>[15]</sup>,由

于样品中泛酸钙含量低,在 210 nm 测定的峰面积较小,虽然满足定量限要求(约为定量限 20 倍),但 200 nm 处测定峰面积较 200 nm 测定值提高约 4 倍,略低于 195 nm 的测定值,能有效减少积分误差以及避免流动相和样品其他组分对泛酸钙测定的干扰,因此最终选择 200 nm 作为泛酸钙的测定波长。由于该药为典型的中西药复方制剂,中药成分对相关组分的液相测定仍有较大干扰,同时待测组分在不同波长处的紫外吸收也有差异,因此按处方比例配制混合对照品溶液,通过 DAD 检测得到相关组分光谱图(如图 2)。由光谱图可知,交点在 270 nm 左右有交点,而《中华人民共和国药典》2015 版二部收载的氢氯噻嗪含量测定波长为 271 nm,考虑含测的均衡性,尽可能保证待测组分在测定波长下均有较大吸收,同时避免低波长处中药成分对测定的干扰,最终确定为 271 nm 作为测定波长较为合理。因此,泛酸钙在 200 nm 处测定,氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双肼屈嗪及盐酸异丙嗪在 271 nm 处测定。



1. 氢氯噻嗪(hydrochlorothiazide) 2. 维生素 B<sub>6</sub>(pyridoxine hydrochloride)  
3. 硫酸双肼屈嗪(dihydralazine sulfate) 4. 维生素 B<sub>1</sub>(thiamine hydrochloride)  
5. 盐酸异丙嗪(promethazine hydrochloride)

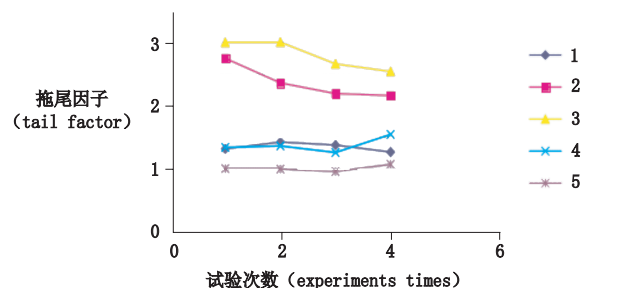
图 2 各组分光谱图

Fig. 2 The spectrum of different component

### 3.4 流动相的选择

该复方制剂中的 6 个化学成分(泛酸钙、氢氯噻嗪、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>1</sub>、硫酸双肼屈嗪及盐酸异丙嗪)极性相近,单一的离子对试剂或磷酸盐流动相,难以达到系统适用性的要求,硫酸双肼屈嗪及盐酸异丙嗪峰形较差,拖尾严重,通过添加不同浓度的三乙胺能有一定改善。同时考虑在流动相中加入适量的

磷酸盐以提高离子对试剂的缓冲能力,改善硫酸双肼屈嗪及盐酸异丙嗪的峰形。以硫酸双肼屈嗪为例,其拖尾因子与流动相种类关系如图 3。



1. 0.1% 辛烷磺酸钠加 1.0% 三乙胺 (0.10% octane sulfonic acid sodium with 1.0% triethylamine)
2. 0.1% 辛烷磺酸钠加 0.1% 三乙胺 (0.10% octane sulfonic acid sodium with 0.1% triethylamine)
3. 0.1% 辛烷磺酸钠加 0.5% 三乙胺 (0.10% octane sulfonic acid sodium with 0.5% triethylamine)
4. 0.1% 辛烷磺酸钠无三乙胺 (0.10% octane sulfonic acid sodium without triethylamine)
5. 0.1% 辛烷磺酸钠加 0.4% 磷酸二氢钾 (0.10% octane sulfonic acid sodium with 0.4% potassium dihydrogen phosphate)

图 3 流动相选择优化图

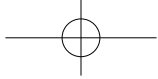
Fig. 3 Optimize mobile phase selection

### 3.5 小结

复方罗布麻片 I 现行标准含量测定项只对处方中氢氯噻嗪做了控制,影响复方制剂质量评价的合理性,本文建立了 HPLC 双波长法同时测定复方罗布麻片 I 中 6 个成分组分,相对于其他文献,该复方制剂中化药成分的含量测定方法简便易行,可操作性强,重现性好。经研究表明,硫酸双肼屈嗪在酸性溶液中稳定性较好,且现行标准中未对其进行含量控制。实验中发现复方制剂中的硫酸双肼屈嗪含量较低,未能符合处方投料的配比,为后期该复方制剂的工艺优化及质量标准的建立和完善提供科学依据。

### 参考文献

- [1] 陆兴毅,周泽良. HPLC 法测定复方罗布麻片 I 中氢氯噻嗪和硫酸双肼屈嗪的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(5): 597  
LU XY, ZHOU ZL. HPLC determination of hydrochlorothiazide and dihydralazine sulfate in compound kendir leaves tablets I by HPLC [J]. China Pharm, 2009, 12(5): 597
- [2] ANDRIEUX P, PATRIC F, KILINC T, et al. Pantothenic acid (vitamin b5) in fortified foods: comparison of a novel ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method and a microbiological assay (AOAC Official Method 992.07) [J]. Aoac



- Intl, 2012, 95(1): 143
- [3] 许会, 汤卫国, 黄春玉, 等. HPLC 法测定复方氨氯地平缬沙坦氢氯噻嗪片剂溶出度[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 46
- XU H, TANG WG, HUANG CY, *et al.* HPLC determination of the dissolution of compound amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide tablets[J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(1): 46
- [4] 刘海清. HPLC 测定复方罗布麻片中罗布麻甲素的含量[J]. 中成药, 2004, 26(5): 91
- LIU HQ. HPLC determination of isoquercitrin in compound kendir leaves tablets[J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(5): 91
- [5] 王建平, 汪明志. HPLC 测定珍菊降压片中氢氯噻嗪不确定度分析[J]. 中国执业药师, 2016, 13(8): 27
- WANG JP, WANG MZ. Uncertainty for determination of hydrochlorothiazide in Zhenju Jiangya tablets by HPLC[J]. Chin Licens Pharm, 2016, 13(8): 27
- [6] HISHAM H. High performance liquid chromatography for simultaneous determination of xipamide, triamterene and hydrochlorothiazide in bulk drug samples and dosage forms[J]. Acta Pharm, 2016, 66(10): 109
- [7] 卢晓梅. HPLC 法同时测定复方罗布麻片 I 中氢氯噻嗪和盐酸异丙嗪的含量及含量均匀度[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1891
- LU XM. Simultaneous determination of contents and content uniformity of hydrochlorothiazide and promethazine hydrochloride in compound kendir leaves tablets I by HPLC[J]. China Pharm, 2014, 17(11): 1891
- [8] 李清艳, 乔湜, 刘国如, 等. 复方罗布麻片 I 中 7 种成分的 UPLC-MS/MS 分段离子切换法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(11): 1450
- LI QY, QIAO T, LIU GR, *et al.* Determination of seven components in Fufang Luobuma I tablets by UPLC-MS/MS combined with ion switching technology[J]. Chin J Pharm, 2016, 47(11): 1450
- [9] BHOIR SI. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010; 52,(3): 62
- [10] ZORICA V, NEDZAD M. Simultaneous analysis of irbesartan and hydrochlorothiazide: an improved HPLC method with the aid of a chemometric protocol[J]. Molecules, 2012, 17(10): 3461
- [11] 耿银银, 许丽晓. 亲水作用色谱法测定阿卡波糖含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 818
- GENG YY, XU LX. Determination of acarbose content by hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(5): 818
- [12] 杨小林, 邱栋樑. HPLC 梯度洗脱法测定硝苯地平氢氯噻嗪片中两组分的含量[J]. 海峡药学, 2015, 27(8): 57
- YANG XL, QIU DL. Determination of two components in nifedipine hydrochlorothiazide tablets by HPLC gradient elution method[J]. Strait Pharm J, 2015, 27(8): 57
- [13] 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
- QIAN ZY. Determination of the contents of three components in compound kendir leaf tablets I by HPLC[J]. Chin Pharm, 2009, 12(9): 1265
- [14] 翁水旺. RP-HPLC 法测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中维生素 B<sub>1</sub> 和维生素 B<sub>6</sub> 的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(6): 645
- WENG SW. RP-HPLC determination of pyridoxine hydrochloride and thiamine hydrochloride in compound trivitamin and calcium pantothenate syrup[J]. Chin J Pharm Anal, 2004, 24(6): 645
- [15] 祝莉莎, 刘君康, 吴鹏宇, 等. HPLC 法同时测定复方利血平片中硫酸双肼屈嗪等 5 种成分[J]. 现代科学仪器, 2013,(4): 193
- ZHU LS, LIU JK, WU PY, *et al.* Simultaneous determination of dithydralazine sulfate in five components such as reserpine tablets by HPLC[J]. Mod Sci Instrum, 2013,(4): 193

(本文于 2018 年 5 月 26 日修改回)