

高效液相色谱法测定珍菊降压片中绿原酸、盐酸可乐定、氢氯噻嗪的含量及含量均匀度

鲁敏, 龚青, 金樟照, 戚雁飞 (浙江省药品检验所, 杭州 310004)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定珍菊降压片中盐酸可乐定、氢氯噻嗪的含量及含量均匀度。方法 采用 C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 测定盐酸可乐定的流动相为乙腈-0.2%磷酸 (5:95), 检测波长为 210 nm; 测定氢氯噻嗪的流动相为甲醇-0.1%磷酸 (15:85), 检测波长为 332 nm; 流速 1 mL/min。结果 线性范围: 盐酸可乐定 7.132 ~ 142.64 ng ($r^2 = 1.0000$); 绿原酸 0.0511 ~ 0.6132 μ g ($r = 0.9999$); 氢氯噻嗪 1.0023 ~ 12.0276 μ g ($r = 1.0000$)。加样回收率: 盐酸可乐定为 99.5%, RSD 为 2.7% ($n = 9$); 绿原酸为 99.7%, RSD 为 1.57% ($n = 9$); 氢氯噻嗪为 100.4%, RSD 为 1.03% ($n = 9$)。结论 本方法操作简单, 结果准确, 可作为控制本产品质量的方法。

关键词: 珍菊降压片; 盐酸可乐定; 氢氯噻嗪; 绿原酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.720.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)06-0495-03

Determination of clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and chlorogenic acid and uniformity in Zhenju Jiangya tablets by HPLC

LU Min, GONG Qing, JIN Zhang-zhao, QI Yan-fei (Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop HPLC methods for determination of clonidine hydrochloride, hydrochlorothiazide and chlorogenic acid uniformity in Zhenju Jiangya tablets. **METHODS** The HPLC analysis was performed on a Agilent Zorbax Extend C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), clonidine hydrochloride was separated using the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.2% H_3PO_4 (5:95), detected at 210 nm, hydrochlorothiazide and chlorogenic acid were done using the mobile phase consisted of methanol and 0.1% H_3PO_4 (15:85), monitored at 332 nm, flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. **RESULTS** The linearity ranges of clonidine hydrochloride, chlorogenic acid and hydrochlorothiazide were 7.132 ~ 142.64 ng ($r^2 = 1.0000$), 0.0511 ~ 0.6132 μ g ($r = 0.9999$), 1.0023 ~ 12.0276 μ g ($r = 1.0000$), the recovery rate of analytical method was 99.5%, RSD was 2.2% ($n = 5$) for clonidine hydrochloride, was

99.7%, RSD was 0.92% ($n=6$) for chlorogenic acid, was 100.4%, RSD was 1.03% ($n=6$) for hydrochlorothiazide, respectively.

CONCLUSION The methods developed are simple and accurate, and can be used to control the quality of Zhenju Jiangya tablets.

KEY WORDS: Zhenju Jiangya tablets; clonidine hydrochloride; hydrochlorothiazide; chlorogenic acid; HPLC

珍菊降压片原标准收载卫生部《药品标准》中药成方制剂第20册,为复方制剂,内含野菊花膏粉、珍珠层粉、芦丁及化学药物盐酸可乐定和氢氯噻嗪等,具有很好的降压疗效,为高血压患者的常用药,但原标准无含量测定项,不能有效地控制药品的质量。本实验研究用高效液相色谱法测定该制剂中盐酸可乐定、氢氯噻嗪的含量及含量均匀度,并在测氢氯噻嗪的同时测定野菊花中绿原酸的含量,方法简便,准确,可用于该制剂盐酸可乐定、氢氯噻嗪及野菊花的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1100(备有DAD检测器)液相色谱仪。北京普析TU-1901双光束紫外可见分光光度计。

盐酸可乐定(批号0071-9504,供含量测定用)、氢氯噻嗪(批号10309-0001,供含量测定用)、绿原酸(批号110753-200212,供含量测定用)均由中国药品生物制品检定所提供。乙腈、甲醇为色谱纯,其余为分析纯。样品由交大昂力穗轮药业有限公司提供(批号:20031001、20031002、20031003)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax Extend C_{18} (250mm \times 4.6mm, 5 μ m);乙腈-0.2%磷酸(5:95)为流动相;检测波长为210nm;流速1mL/min。在此条件下样品中盐酸可乐定能得到较好分离且缺味无干扰。

甲醇-0.1%磷酸(15:85)为流动相;检测波长为332nm;流速1mL/min。在此条件下氢氯噻嗪、绿原酸能得到较好分离,缺味无干扰。

2.2 对照品溶液、供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取在105 $^{\circ}$ C干燥至恒重的盐酸可乐定对照品适量,精密称定,加水制成每1mL中含6 μ g的溶液,作为盐酸可乐定对照品。

精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥24h的绿原酸、氢氯噻嗪对照品适量,加50%乙醇制成每1mL中含绿原酸25 μ g、氢氯噻嗪0.5mg的混合溶液。

2.2.2 供试品溶液 取重量差异项下的本品,研细,取粉末约0.25g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氢氧化钠1mL使充分湿润,放置15min,加三氯甲烷15mL,超声处理(功率300W,频率50kHz)20min,用加有无水硫酸钠3g的滤纸滤过,用三氯甲烷20mL分次洗涤容器与滤渣,合并滤液和洗液,水浴蒸至近干,残渣用甲醇溶解,并转移至5mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,作为测定盐酸可乐定的供试品溶液。

取本品20片,精密称定,研细,取约0.5g,精密称定,置具塞烧瓶中,精密吸取50%甲醇25mL,称定重量,超声处理30min,放至室温,加50%甲醇补足重量,摇匀,用微孔滤膜

(0.45 μ m)滤过,作为测定氢氯噻嗪和绿原酸的供试品溶液。

2.3 线性关系考察

精密量取盐酸可乐定(14.264 μ g/mL)0.5,1,2,4,6,8,10 μ L注入液相色谱仪,测定峰面积 Y ,得回归方程: $Y=4.96X+2.44$, $r^2=1.0000$,显示进样量在7.132~142.64ng范围内有良好的线性关系。

精密量取绿原酸(51.1 μ g/mL)与氢氯噻嗪(1.0032mg/mL)混合液1,2,4,6,8,10,12 μ L注入液相色谱仪,测定峰面积 Y ,得回归方程:绿原酸 $Y=2.8145X-505182$, $r=0.9999$,显示进样量在0.0511~0.6132 μ g范围内有良好的线性关系(见表3)。氢氯噻嗪 $Y=392.6225X-0.9080$, $r=1.0000$,显示进样量在1.0023~12.0276 μ g范围内也有良好的线性关系。

2.4 精密度

取盐酸可乐定对照品溶液、绿原酸、氢氯噻嗪对照品溶液,按上述色谱条件,重复进样6次,测定峰面积,结果盐酸可乐定RSD=0.27%($n=6$),绿原酸RSD=0.44%($n=6$),氢氯噻嗪RSD=0.27%($n=6$)。

2.5 稳定性

取盐酸可乐定供试品溶液、绿原酸、氢氯噻嗪对照品溶液和供试品溶液,按以上色谱条件,每隔一定时间进样1针,测定峰面积,结果显示样品至少在30h内稳定。

2.6 阴性对照

取缺盐酸可乐定空白样品、缺野菊花空白、缺氢氯噻嗪空白样品按供试品制备法制备,并取相当于供试品的量注入液相色谱仪,结果显示在盐酸可乐定相同保留时间处无吸收峰,在绿原酸相同保留时间处及氢氯噻嗪相同保留时间处无吸收峰。

2.7 重复性

取同一批号样品(031001)6份,分别精密称定,按正文方法测定峰面积并计算盐酸可乐定含量(μ g/g),结果显示盐酸可乐定平均含量为97.69 μ g/g,RSD为2.2%($n=6$);绿原酸平均含量为1.04mg/g,RSD为0.92%($n=6$);氢氯噻嗪平均含量为19.70mg/g,结果RSD为0.34%($n=6$)。

2.8 加样回收率

精密称定已知含量样品(批号031001)9份,精密加入盐酸可乐定对照品适量,按正文方法处理后测定峰面积并计算含量,结果显示盐酸可乐定平均回收率为99.5%,RSD=2.7%,见表1。

精密称定已知含量样品6份,精密加入绿原酸、氢氯噻嗪对照品适量,按正文方法处理后测定峰面积并计算含量,结果显示绿原酸平均回收率为99.7%,RSD=1.57%,见表2。氢氯噻嗪平均回收率为100.4%,RSD=1.03%,见表3。

表 1 盐酸可乐定回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery testing for clonidine hydrochloride

weight (g)	Amount in Sample (mg)	Amount spiked (mg)	Amount found (mg)	Recovery Rates (%)	Mean (%)	RSD (%)
0.2510	24.5202	22.8224	47.1892	99.33		
0.2531	24.7253	22.8224	47.2951	98.89		
0.2520	24.6179	22.8224	47.7504	101.36		
0.2529	24.7058	28.5280	52.4651	97.31		
0.2495	24.3737	28.5280	52.7826	99.58	99.5	2.7
0.2493	24.3541	28.5280	51.6184	95.57		
0.2513	24.5495	34.2336	59.0489	100.78		
0.2531	24.7253	34.2336	60.6085	104.82		
0.2530	24.7156	34.2336	58.2042	97.82		

表 2 绿原酸回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery testing for chlorogenic acid

weight (g)	Amount in Sample (mg)	Amount spiked (mg)	Amount found (mg)	Recovery Rates (%)	Mean (%)	RSD (%)
0.2508	0.2606	0.2044	0.4717	103.3		
0.2511	0.2609	0.2044	0.4619	98.3		
0.2516	0.2614	0.2044	0.4626	98.4		
0.2527	0.2626	0.2555	0.5168	99.5		
0.2520	0.2618	0.2555	0.5185	100.5	99.7	1.57
0.2511	0.2609	0.2555	0.5161	99.9		
0.2513	0.2611	0.3066	0.5679	100.1		
0.2515	0.2613	0.3066	0.5627	98.3		
0.2519	0.2617	0.3066	0.5656	99.1		

表 3 氢氯噻嗪回收率试验结果

Tab 3 Results of recovery testing for hydrochlorothiazide

weight (g)	Amount in Sample (mg)	Amount spiked (mg)	Amount found (mg)	Recovery Rates (%)	Mean (%)	RSD (%)
0.2508	4.9418	4.0128	9.0293	101.9		
0.2511	4.9477	4.0128	8.9347	99.4		
0.2516	4.9575	4.0128	8.9383	99.2		
0.2527	4.9792	5.0160	9.9772	99.6		
0.2520	4.9454	5.0160	10.0387	101.1	100.4	1.03
0.2511	4.9477	5.0160	10.0259	101.2		
0.2513	4.9516	6.0192	11.0513	101.3		
0.2515	4.9556	6.0192	10.9381	99.4		
0.2519	4.9634	6.0192	11.0264	100.7		

2.9 样品测定

按正文方法测定 3 批样品,结果盐酸可乐定含量分别为 85.99%, 102.07%, 99.16%; 绿原酸含量为 0.25 mg/片, 0.24 mg/片, 0.24 mg/片; 氢氯噻嗪含量为 101.61%, 101.69%, 100.33%。

3 盐酸可乐定和氢氯噻嗪含量均匀度测定方法

3.1 盐酸可乐定含量均匀度测定

根据盐酸可乐定含量测定方法取样量为 0.25g, 实际为本品 1 片的量, 故按照盐酸可乐定含量测定方法测定盐酸可

乐定含量均匀度。由于盐酸可乐定在本制剂中量较低, 故将其含量均匀度限度定为 80.0% ~ 120.0%。经测定样品三批, 结果均符合规定。

表 4 盐酸可乐定含量均匀度测定结果

Tab 4 Results of uniformity testing for clonidine hydrochloride

Lot No.	A + 1.80S
031001	10.26
031002	11.73
031003	10.53

3.2 氢氯噻嗪含量均匀度测定

按照质量标准氢氯噻嗪含量测定方法测定, 取样量为 1 片, 其测定浓度在含量测定方法学研究线性范围内。由于包衣材料为水溶性, 故以少量水使片子溶散后提取。经测定样品三批, 结果均符合规定。

表 5 氢氯噻嗪含量均匀度测定结果

Tab 5 Results of uniformity testing for hydrochlorothiazide

Lot No.	A + 1.80S
031001	13.05
031002	12.77
031003	12.32

4 讨论

4.1 测定波长的选择

取盐酸可乐定适量, 加甲醇制成对照品溶液, 置紫外分光光度计下记录其紫外吸收光谱, 结果显示盐酸可乐定在 272nm 波长处有最大吸收, 但本制剂盐酸可乐定含量较低, 且 272nm 波长处吸收较弱, 故选择 210nm 为测定波长。

取绿原酸适量, 加甲醇制成对照品溶液, 置紫外分光光度计下记录其紫外吸收光谱, 结果显示绿原酸在 335.5nm 和 332.0nm 波长处有最大吸收, 取氢氯噻嗪适量, 加甲醇制成对照品溶液, 置紫外分光光度计下记录其紫外吸收光谱, 结果显示氢氯噻嗪 317.5nm 和 271.0nm 波长处有最大吸收, 参考中国药典中收载的绿原酸测定波长选择 332nm 为测定波长。为使绿原酸和氢氯噻嗪两个含量一起测定, 且氢氯噻嗪在 332nm 处也有较大的吸收, 故选择 332.0nm 波长。

4.2 提取方法的选择

根据盐酸可乐定的溶解性能, 采用碱化后三氯甲烷超声提取。经比较超声提取时间 10, 20, 30min, 在较短时间内即能提取完全, 为确保提取完全, 选择超声处理 20min。

由于绿原酸和氢氯噻嗪易溶于甲醇和水, 因此采用 50% 甲醇作溶剂, 本品提取物经超声后全部溶解, 放置后仅有少量辅料沉积, 故选择超声溶解方法。

参考文献

- [1] Chp, Vol.1, 2005. (中国药典 2005 年版一部).
- [2] Standard Monographs of Chinese Patent Medicine, Vol.20, Ministry of Health People's Republic of China. (卫生部《药品标准》中药成方制剂第 20 册).

收稿日期: 2005-08-09