

# HPLC法同时测定苯磺酸氨氯地平原料药及片剂中8种已知有关物质的含量

王全洪\*, 吴丹, 王玉和<sup>#</sup>(遵义医学院附属医院药剂科, 贵州遵义 563099)

中图分类号 R927.2; R972\*.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2369-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.24

**摘要** 目的: 建立一种能同时测定苯磺酸氨氯地平原料药及其片剂中8种已知有关物质(杂质A~H)的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 流动相A为0.05 mol/L的磷酸二氢钠溶液-甲醇(90:10, pH 3.0), 流动相B为0.02 mol/L的磷酸二氢钠溶液-甲醇(10:90), 梯度洗脱, 流速为1.0 ml/min, 检测波长为237 nm, 柱温为30 ℃。结果: 主成分及8种有关物质检测质量浓度线性范围均为0.5~15 μg/ml ( $r > 0.999$ ), 检测限为0.5~3.2 ng/ml, 定量限为2.0~6.6 ng/ml, 精密度RSD均 < 0.5%。各厂家样品中的有关物质主要为杂质C、D和H, 且片剂与原料药中杂质含量基本一致。结论: 该方法具有重复性好、灵敏度高等特点, 可用于控制苯磺酸氨氯地平原料药及片剂的有关物质。

**关键词** 苯磺酸氨氯地平; 片剂; 原料药; 有关物质; 高效液相色谱法; 含量测定

## Determination of 8 Known Related Substances in Crude Drug and Tablet of Amlodipine Besylate by HPLC

WANG Quan-hong, WU Dan, WANG Yu-he (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563099, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of 8 known related substances (impurity A-H) in crude drug and tablet of amlodipine besylate. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> column with 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-methanol (90:10, pH 3.0) as mobile phase A and 0.02 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-methanol (10:90) as mobile phase B (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 237 nm, and the column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges of main component and 8 related substances were 0.5-15 μg/ml ( $r > 0.999$ ). The detection limits were 0.5-3.2 ng/ml. The quantitation limits were 2.0-6.6 ng/ml. RSD of precision test was lower than 0.5%. Related substance of manufacturers mainly were impurity C, D and H, and the contents of impurity in the tablet were similar to those in the crude drug. CONCLUSIONS: This method is reproducible and sensitive, and can be used for the quality control of crude drug and tablet of amlodipine besylate.

**KEY WORDS** Amlodipine besylate; Tablet; Crude drug; Related substances; HPLC; Content determination

- 2007, 29(9):1 862.
- [2] Rutar T, Cockerham KP. Periorbital zygomycosis (mucormycosis) treated with posaconazole[J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 142(1):187.
- [3] Tu EY, McCartney DL, Beatty RF, et al. Successful treatment of resistant ocular fusariosis with posaconazole (SCH-56592)[J]. *Am J Ophthalmol*, 2007, 143(2):222.
- [4] Durand ML, Kim IK, Amico DJ, et al. Successful treatment of Fusarium endophthalmitis with voriconazole and Aspergillus endophthalmitis with voriconazole plus caspofungin[J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140(3):552.
- [5] Klont RR, Eggink CA, Rijs AJMM, et al. Successful treatment of Fusarium keratitis with corneal transplantation and topical and systemic voriconazole[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(12):e110.
- [6] Sponsel WE, Graybill JR, Nevarez HL, et al. Ocular and systemic posaconazole (SCH-56592) treatment of invasive Fusarium solani keratitis and endophthalmitis[J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(7):829.
- [7] Neubauer W, König A, Bolek R, et al. Determination of the antifungal agent posaconazole in human serum by HPLC with parallel column-switching technique[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(24):2 493.
- [8] Wissen CP, Burger DM, Verweij PE, et al. Simultaneous determination of the azoles voriconazole, posaconazole, isavuconazole, itraconazole and its metabolite hydroxyitraconazole in human plasma by reversed phase ultra-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 887/888:79.
- [9] Shen JX, Krishna G, Hayes RN. A sensitive liquid chromatography and mass spectrometry method for the determination of posaconazole in human plasma[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 43(1):228.
- [10] Liao HW, Lin SW, Wu UI, et al. Rapid and sensitive determination of posaconazole in patient plasma by capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012(1 226):48.

(收稿日期:2013-03-07 修回日期:2013-04-02)

\* 主管药师。研究方向: 医院药学。电话: 0852-8608428。E-mail: wqh1127@163.com

<sup>#</sup> 通信作者: 主任药师。研究方向: 医院药学、药剂学。E-mail: wangyuhe11@163.com

苯磺酸氨氯地平片由美国辉瑞制药公司于1992年研发上市,属于二氢吡啶类钙离子通道拮抗药,用于原发性高血压的治疗,其疗效显著<sup>[1-2]</sup>。该产品市场需求量大,在国内已有几十家原料药及制剂上市(包括不同的盐)。氨氯地平化合物及合成制备工艺专利早已过期,国内原料药厂家的合成路线大同小异,所以在原料药合成工艺过程中可能引入的工艺杂质基本相同。现苯磺酸氨氯地平中可能的已知杂质有8种(杂质A、B、C、D、E、F、G、H)<sup>[3]</sup>,其质量标准收载于《美国药典》、《欧洲药典》以及国内转正标准中。《欧洲药典》(EP7.0)对上述杂质进行了介绍,但只对其中的杂质A、B、D、E、F、G进行了控制<sup>[3-4]</sup>,国内标准(如转正标准24、47、48册等)<sup>[5-7]</sup>均未对上述杂质进行介绍和控制。此外,已有的研究<sup>[8-13]</sup>仅建立了苯磺酸氨氯地平及其杂质总量的分析方法,但是缺乏同时对苯磺酸氨氯地平及其8种已知有关物质的定性定量分析方法。譬如,韩启银等<sup>[8]</sup>和方顺干等<sup>[9]</sup>分别建立了测定苯磺酸氨氯地平分散片和苯磺酸氨氯地平片含量的高效液相色谱(HPLC)法;已有研究建立了测定苯磺酸氨氯地平的含量及有关物质总量的HPLC法<sup>[10]</sup>和反相HPLC法<sup>[11]</sup>,未对具体的物质成分进行定性定量分析;董煜等<sup>[12]</sup>也只建立了定量测定苯磺酸氨氯地平片有关物质总量的HPLC分析方法。

由于已有的方法不能在同一色谱条件下同时有效检出氨氯地平杂质A、B、C、D、E、F、G、H,为此,建立一种HPLC法能同时有效检出氨氯地平原料药中可能产生的已知杂质(杂质A、B、C、D、E、F、G、H)及其他杂质,将其可能的杂质控制在一定的范围内就显得尤为适用。为此,经过色谱条件优化,笔者建立了苯磺酸氨氯地平片及原料药中8种已知有关物质含量的测定方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪、二极管阵列检测器(DAD,美国安捷伦科技有限公司);BT25S型电子天平、FE20型PH计[瑞士梅特勒-托利多(中国)有限公司]。

### 1.2 试剂与药品

苯磺酸氨氯地平片(商品名:洛活喜,大连辉瑞制药有限公司,批号:1005055,规格:每片5mg);苯磺酸氨氯地平原料药(A厂,批号:201109021,纯度:99.4%;B厂,批号:20101104,纯度:99.1%;C厂,批号:20110327,纯度:99.6%);马来酸氨氯地平原料药(D厂,批号:20101235,纯度:99.7%);甲醇、乙腈和磷酸均为色谱纯,磷酸二氢钠为分析纯,试验用水均为超纯水。苯磺酸氨氯地平及各杂质对照品来源见表1。

表1 苯磺酸氨氯地平及各杂质对照来源及批号、纯度

Tab 1 Sources, lot number and purity of amlodipine besylate and its related substances

对照品	供货单位	批号	纯度, %
苯磺酸氨氯地平	美国药典委员会	GOF133	99.8
杂质A	加拿大TRC实验室	002453	99.1
杂质B	欧洲药典委员会	005892	99.3
杂质C	英国LGC实验室	116	98.5
杂质D(USP称杂质A)	美国药典委员会	01629	99.2
杂质E	加拿大TRC实验室	04142	98.6
杂质F	加拿大TRC实验室	003527	98.8
杂质G	欧洲药典委员会	001RB5	99.5
杂质H	加拿大TRC实验室	005261	98.4

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.0 mm, 5 μm);流动相A:0.05 mol/L的磷酸二氢钠溶液-甲醇(90:10, pH 3.0),流动相B:0.02 mol/L的磷酸二氢钠溶液-甲醇(10:90),流速:1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长:237 nm;进样量:20 μl。流动相梯度洗脱程序见表2。

表2 流动相梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient conditions for mobile phase

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	60	40
5	60	40
40	20	80
45	20	80
55	35	65
60	60	40

取苯磺酸氨氯地平适量,加流动相B溶解并稀释制成每1 ml约含苯磺酸氨氯地平1 mg的溶液,作为供试品溶液;另取各杂质对照品适量,加上述供试品溶液溶解并稀释制成每1 ml约含各已知杂质2 μg的混合溶液作为系统适用性试验溶液。按照拟定的色谱条件进样,记录色谱图。理论板数按氨氯地平主峰计应不低于5 000;氨氯地平主峰与杂质D之间的分离度不得小于3.0,各杂质之间的分离度应不低于2.0;氨氯地平与各已知杂质峰的对称因子应在0.9~1.0。各组分的保留时间见表3;混和溶液和A厂家的供试品溶液色谱图见图1,表明各目标组分均得到了很好的分离且峰形较好。

表3 氨氯地平及各杂质的保留时间

Tab 3 Retention time of amlodipine besylate and its related substances

组分	保留时间, min	相对保留时间	分离度	理论板数
苯磺酸	2.678	0.25	4.2	16 239
杂质C	3.637	0.34	5.4	15 210
杂质F	6.368	0.60	4.9	13 045
杂质D	8.282	0.78	4.0	11 462
氨氯地平	10.599	1.00	6.8	12 028
杂质E	14.397	1.36	10.2	10 340
杂质H	25.264	2.38	6.3	9 259
杂质B	29.911	2.82	6.2	8 794
杂质A	34.936	3.30	5.7	8 947
杂质G	39.620	3.74	5.6	7 582

### 2.2 检测波长选择

DAD对氨氯地平及各杂质的扫描结果显示,氨氯地平及其杂质在237 nm波长处有最大吸收,而且在此波长处检出的杂质个数及杂质总量也最大,所以检测波长定为237 nm。

### 2.3 专属性试验

降解试验:在“2.1”项下色谱条件下,分别取苯磺酸氨氯地平样品在酸(加入1 mol/L盐酸溶液5 ml, 60℃水浴中振摇30 min)、碱(加入1 mol/L氢氧化钠溶液5 ml, 60℃水浴中振摇30 min)、氧化(加入15%双氧水5 ml,于60℃水浴中振摇60 min)、高温(在80℃条件下放置8 h)、湿热(溶液在80℃条件下放置8 h)、光照(在6 000 lx条件下放置5 d)条件下进行破坏。结果显示,在各种破坏条件下,氨氯地平与产生的降解杂质及各已知杂质分离良好,苯磺酸与溶剂也不干扰降解杂质的检出。A厂样品酸破坏性试验图谱见图2。

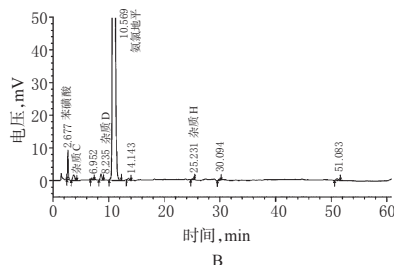
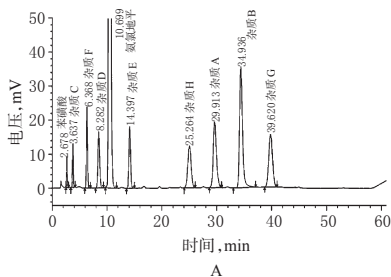


图1 高效液相色谱图

A.混和溶液;B.供试品溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed solution; B. test sample

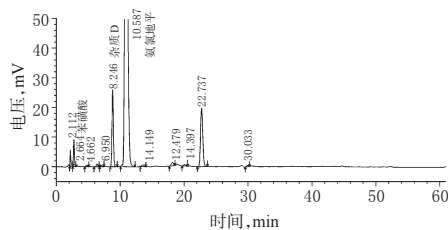


图2 A厂样品酸破坏性试验色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample from A factory in acid destructive test

#### 2.4 线性与校正因子试验

取苯磺酸氨氯地平对照品及各杂质A、B、C、D、E、F、G、H对照品,加流动相B溶解并稀释成质量浓度均为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列溶液,分别进样20  $\mu\text{l}$ ,记录色谱图,采用标准曲线法计算各杂质的校正因子。结果显示氨氯地平及各杂质在0.5~15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时其质量浓度与峰面积线性关系良好,相关系数 $r$ 均 $>0.999$ 。各杂质的校正因子分别是0.92、1.06、1.42、1.87、1.02、0.85、1.04、0.95。由此可见,杂质A、B、E、G、H的校正因子均在0.9~1.1,可以采用不加校正因子的主成分自身对照法计算其杂质含量;杂质C、D和F需要采用加校正因子的主成分自身对照法计算其含量。

#### 2.5 定量限与检测限试验

取氨氯地平及各杂质对照品,用流动相B稀释成一系列质量浓度溶液,进样,记录色谱图,以信噪比10:1考察定量限,以信噪比3:1考察检测限。结果氨氯地平及杂质A、B、C、D、E、F、G、H的定量限分别为2.0、6.6、5.4、2.8、2.7、4.0、4.8、6.4、5.2  $\text{ng}/\text{ml}$  (2.0~6.6  $\text{ng}/\text{ml}$ ),检测限分别为0.5、2.2、1.8、0.7、0.9、1.0、1.2、3.2、1.3  $\text{ng}/\text{ml}$  (0.5~3.2  $\text{ng}/\text{ml}$ )。

#### 2.6 溶液稳定性及精密度试验

取苯磺酸氨氯地平样品适量,加流动相制成每1 ml约含苯磺酸氨氯地平1 mg的溶液,摇匀作为供试品溶液。另取苯磺酸氨氯地平及各杂质对照品适量,加流动相制成每1 ml约

含氨氯地平5  $\mu\text{g}$ 和各已知杂质2  $\mu\text{g}$ 的混合溶液作为混合对照溶液。取供试品溶液和混合对照溶液,在室温条件下放置,分别于0、2、4、6、8、12 h进样,记录色谱图,考察供试品溶液和混合对照溶液在12 h内的稳定情况。结果溶液中各峰面积变化不大,RSD均 $<3.0\%$ ,表明供试品溶液及混合对照溶液于室温下放置12 h稳定。取供试品溶液和混合对照溶液分别连续进样6次,结果,各峰面积变化均不大,RSD均 $<0.5\%$ ,这说明该方法的进样精密度良好。

#### 2.7 不同厂家样品中杂质组分的分析

取从市场上随机购买的不同厂家的苯磺酸氨氯地平片及原料药样品,准确称取一定量制备成供试品溶液,进样分析。结果各厂家样品中的杂质主要为杂质C、D和H,以杂质D的含量最高;片剂与原料药中杂质含量基本一致,均符合EP7.0氨氯地平质量标准中杂质规定的限度要求<sup>[4]</sup>,详见表4。

表4 各厂样品中有关物质含量(%)

Tab 4 Contents of related substances in samples from different factories (%)

杂质	片剂	原料药			
		A厂	B厂	C厂	D厂
杂质A	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质B	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质C	0.10	0.12	0.09	0.11	0.06
杂质D(降解物)	0.17	0.16	0.14	0.21	0.12
杂质E	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质F	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质G	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
杂质H	未检出	0.01	0.03	未检出	0.04
杂质总量	0.65	0.73	0.60	0.82	0.51

#### 3 讨论

本文建立了同时检测苯磺酸氨氯地平样品中及已知的8种有关物质的HPLC分析方法。该方法中各目标组分的峰形良好,组分之间以及与干扰杂质之间均能有效地分离,保留时间也比较适中。该方法具有重现性好、灵敏度高等特点。经实际样品验证,该方法能够同时分析样品中已知的8种有关物质组分,可以用于氨氯地平相关制剂研发过程中的杂质控制。

#### 参考文献

- [1] 焦国亮,支世保,班东林.苯磺酸氨氯地平治疗原发性高血压47例临床疗效观察[J].中国疗养医学,2012,21(11):1012.
- [2] 王玉双.苯磺酸氨氯地平治疗劳累性绞痛临床观察[J].中国医药指南,2010,30(8):84.
- [3] The United States Pharmacopeial Convention. USP34-NF29[S]. Maryland: The United States Pharmacopeial Convention,2010:1872.
- [4] European Directorate for Quality Medicines. EP7.0[S]. Strasbourg: European Directorate for Quality Medicines, 2010:1379-1380.
- [5] 国家药典委员会.新药转正标准24册:苯磺酸氨氯地平片转正质量标准[S].北京:化学工业出版社,2004:868.
- [6] 国家药典委员会.新药转正标准47册:马来酸氨氯地平转正质量标准[S].北京:化学工业出版社,2004:128.
- [7] 国家药典委员会.新药转正标准48册:甲磺酸氨氯地平

# HPLC法同时测定复方坎地沙坦酯氢氯噻嗪片中的主成分含量

谢鹏<sup>1\*</sup>, 王敏<sup>1,2#</sup> (1.唐山市协和医院药剂科, 河北唐山 063004; 2.唐山职业技术学院, 河北唐山 063004)

中图分类号 R927.2; R972\*.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2372-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.25

**摘要** 目的: 建立同时测定复方坎地沙坦酯氢氯噻嗪片中主成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Venusil XBP-C<sub>18</sub>, 以磷酸盐缓冲液(pH 7.0)为水相, 甲醇-乙腈(2:1)混合液为有机相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 40 ℃, 检测波长为 262 nm。结果: 氢氯噻嗪、坎地沙坦酯分离度均大于 1.5, 检测质量浓度线性范围分别为 2.5~100.0、1.62~64.8 mg/L (*r* 均为 0.999 9), 平均回收率分别为 99.23%、99.78%, RSD 分别为 1.23%、0.84% (*n*=9)。结论: 该方法对 2 种主成分分离效果较好, 结果准确、可靠, 适用于同时测定复方坎地沙坦酯氢氯噻嗪片剂中的 2 个主成分的含量。

**关键词** 坎地沙坦酯; 氢氯噻嗪; 片剂; 含量测定; 高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of Main Components in Compound Hydrochlorothiazide/Candesartan Cilexetil Tablets by HPLC

XIE Peng<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1,2</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Tangshan Union Hospital, Hebei Tangshan 063004, China; 2. Tangshan Vocational & Technical College, Hebei Tangshan 063004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of main components in Compound hydrochlorothiazide/candesartan cilexetil tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Venusil XBP-C<sub>18</sub> column with phosphate buffer (pH 7.0) as water phase and methanol-acetonitrile (2:1) as organic phase (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 40 ℃, and detection wavelength was set at 262 nm. RESULTS: The separation rates of hydrochlorothiazide and candesartan cilexetil were all more than 1.5. The linear ranges were 2.5-100.0 mg/L for hydrochlorothiazide and 1.62-64.8 mg/L for candesartan cilexetil (all *r*=0.999 9). The mean recoveries were 99.23% (RSD=1.23%, *n*=9) and 99.78% (RSD=0.84%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: 2 kinds of main components are well-separated by this method. The method is accurate and reliable, and suitable for simultaneous determination of 2 kinds of main components in Compound hydrochlorothiazide/candesartan cilexetil tablets.

**KEY WORDS** Candesartan cilexetil; Hydrochlorothiazide; Tablets; Content determination; HPLC

坎地沙坦酯是血管紧张素(Ang) II AT<sub>1</sub>受体亚型的高选择性竞争性拮抗药,能够有效降低轻、中度高血压患者的血压,且不良反应发生率较低<sup>[1-3]</sup>。氢氯噻嗪是一种噻嗪类利尿剂,其降压机制目前虽尚未完全明确,但已知其能影响肾小管对电解质的重吸收机制,直接增加钠和氯的排泄。两者合用对降低血压有相加作用,并且可以克服两药单独使用时引起的多种不良反应<sup>[4-5]</sup>。

复方坎地沙坦酯氢氯噻嗪片目前在各国药典中均未收载。在美国FDA规定的该药物溶出度的测定方法中,溶出介质中加入了聚山梨酯20<sup>[6]</sup>。而采用文献<sup>[7-9]</sup>报道的方法,笔者发

现溶出介质中的聚山梨酯20可影响氢氯噻嗪的含量测定,导致聚山梨酯20与氢氯噻嗪色谱峰不能完全分离。故笔者采用梯度洗脱的高效液相色谱(HPLC)法,建立了可同时测定复方坎地沙坦酯氢氯噻嗪片剂中2种成分含量的方法,为该复方制剂的质量控制提供了一种准确可靠的分析方法。

### 1 材料

1200 HPLC系统(美国Agilent公司); BP211D电子天平(德国Satorius公司)。

坎地沙坦酯原料药(浙江华海药业股份有限公司,批号: 11-20120106,纯度: ≥99.5%); 氢氯噻嗪原料药(苏州立新医

转正质量标准[S].北京:化学工业出版社,2004:55.  
[8] 韩启银,张根元,陶伟博,等.高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平分散片的含量[J].江苏药学与临床研究,2005,13(6):19.  
[9] 方顺干,俞佳,蒋振,等.高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平片的含量[J].药物鉴定,2006,15(12):23.

\* 副主任药师。研究方向:药学。E-mail: xiepd@163.com  
# 通信作者:副教授。研究方向:药理学。E-mail: wangm65@163.com

[10] 徐国津,李新春.高效液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平的含量及有关物质[J].中国药学杂志,2008,43(1):60.  
[11] 胡在林.反相液相色谱法测定苯磺酸氨氯地平胶囊的含量及有关物质[J].药物鉴定,2011,20(12):28.  
[12] 董煜,钱小平,孙晶晶.HPLC法测定苯磺酸氨氯地平片的有关物质[J].中国药品标准,2010,11(3):213.  
[13] 吕煜.苯磺酸氨氯地平片的质量控制研究[J].中国医院用药评价与分析,2012,12(3):236.

(收稿日期:2013-04-11 修回日期:2013-04-25)