

## HPLC 法测定清脑降压片中非法添加的氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平

裴月梅

安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051

**摘要:** 目的 建立清脑降压片中非法添加氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平的 HPLC 分析方法。方法 采用 HPLC 法, 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (APOLLO 色谱柱 C<sub>18</sub> 250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液, 进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长为 251 nm。结果 氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平和硝苯地平的线性范围分别为 21.24~2 124.0 ng ( $r=1.000 0$ ), 16.184~1 618.4 ng ( $r=1.000 0$ ), 19.72~1 972.0 ng ( $r=1.000 0$ ), 18.976~1 897.6 ng ( $r=1.000 0$ ) 和 22.504~2 250.4 ng ( $r=1.000 0$ ); 平均回收率 ( $n=6$ ) 分别为 100.93%、101.61%、103.07%、97.58%、96.36%; RSD 分别为 1.52%、1.21%、1.08%、0.73%、0.48%。抽查的 5 个厂家 5 批清脑降压片中均未检出非法添加此 5 种成分。结论 该方法较为准确, 且重复性好, 可作为清脑降压片中非法添加氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平的有效分析方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 清脑降压片; 氢氯噻嗪; 盐酸哌唑嗪; 盐酸异丙嗪; 利血平; 硝苯地平

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3414-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.011

## Determination of hydrochlorothiazide, prazosin hydrochloride, promethazine hydrochloride, reserpine, and nifedipine illegally added into Qingnao Jiangya Tablets by HPLC method

PEI Yue-mei

Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China

**Abstract: Objective** To set up an HPLC method for the determination of hydrochlorothiazide, prazosin hydrochloride, romethazine hydrochloride, reserpine, and nifedipine illegally added into Qingnao Jiangya Tablets (QJT). **Methods** HPLC method was used. Octadecyl silane bonded silica as a filler (APOLLO C<sub>18</sub> column, 250 mm × 4.6 mm) was used with the mobile phase consisting of water containing 0.02% phosphoric acid and acetonitrile in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25 °C, and detection wavelength was set at UV 251 nm. **Results** The calibration curve showed the good linearity for hydrochlorothiazide, prazosin hydrochloride, romethazine hydrochloride, reserpine, and nifedipine in the ranges of 21.24—2 124.0 ng ( $r = 1.000 0$ ), 16.184—1 618.4 ng ( $r = 1.000 0$ ), 19.72—1 972.0 ng ( $r = 1.000 0$ ), 18.976—1 897.6 ng ( $r = 1.000 0$ ), and 22.504—2 250.4 ng ( $r = 1.000 0$ ), respectively; The average recovery rates ( $n = 6$ ) were 100.93%, 101.61%, 103.07%, 97.58%, and 96.36%, respectively; RSD values were 1.52%, 1.21%, 1.08%, 0.73%, and 0.48%, respectively. **Conclusion** The accurate and reproducible method can be used for the determination of hydrochlorothiazide, prazosin hydrochloride, romethazine hydrochloride, reserpine, and nifedipine illegally added into QJT.

**Key words:** HPLC; Qingnao Jiangya Tablets; hydrochlorothiazide; prazosin hydrochloride; romethazine hydrochloride; reserpine; nifedipine

清脑降压片质量标准收载于《中国药典》2010 年版一部, 由黄芩 100 g、夏枯草 60 g、槐米 60 g、磁石 (煅) 60 g、牛膝 60 g、当归 100 g、地黄 40 g、丹参 40 g、水蛭 20 g、钩藤 60 g、决明子 100 g、地

收稿日期: 2014-09-08

基金项目: 国家食品药品监督管理局稽查局专项

作者简介: 裴月梅 Tel: (0551)63358112 E-mail: pymahyjs@163.com

龙 20 g、珍珠母 40 g 组成, 13 味中药中, 珍珠母、磁石、当归、钩藤粉碎成细粉, 过筛; 其余黄芩等 9 味药加水煎煮 2 次, 第 1 次 3 h, 第 2 次 2 h, 合并煎液, 滤过, 滤液减压浓缩成膏, 加入珍珠母等细粉, 混匀, 制成颗粒, 干燥, 压制成 1 000 片, 包糖衣, 即得<sup>[1]</sup>。由于原清脑降压片中未列入非法添加降压类化学药物的检查和定量测定方法; 原清脑降压片补充检验方法仅检测样品中非法添加氢氯噻嗪、盐酸异丙嗪。近年来降压类化学药物氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平原料药购买容易, 完全可能被不法分子用来添加到清脑降压片等同类中成药中, 且目前市场抽检结果显示已出现非法添加功效成分的案例<sup>[2-3]</sup>, 因而有必要建立目前较普及的高效液相色谱测定方法, 检测样品中上述 5 种降压类化学药物的量<sup>[4]</sup>。

### 1 仪器与试药

AE240 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; LC-20A 全自动高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司。

对照品氢氯噻嗪 (批号 100309-200702)、盐酸哌唑嗪 (批号 100164-200402)、盐酸异丙嗪 (批号 100422-200501)、利血平 (批号 100041-200311) 和硝苯地平 (批号 100338-200502), 所有对照品质量分数均 >98%, 均由中国食品药品检定研究院提供。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。清脑降压片, 吉林福康医药生物科技有限公司, 批号 081201; 河北安国药业集团有限公司, 批号 106307; 湖南省回春堂药业有限公司, 批号 20090707; 青海可可西里药业集团有限公司, 批号 20100318; 西安澜泰药业有限公司, 批号 20100504; 样品均由国家食品药品监督管理局市场监督办发文后, 由相关企业提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (APOLLO 色谱柱 C<sub>18</sub>: 250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2% 磷酸水溶液进行梯度洗脱: 0~10 min, 20%~30% 乙腈; 10~25 min, 30%~45% 乙腈; 25~35 min, 45%~20% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长为 251 nm, 进样量为 20 μL。理论塔板数按氢氯噻嗪峰计算应不低于 4 000。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 避光操作。取氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平各 10 μg/mL 的溶液, 即得<sup>[5]</sup>。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 避光操作。取各厂家提供的清脑降压片内容物, 研细, 取约 0.3 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇适量, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 15 min, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液稀释 10 倍, 即得。

### 2.3 系统适应性试验

取混合对照品溶液, 注入液相色谱仪中, 结果 4 种对照品理论板数均大于 4 000; 测得分离度为 9.0, 拖尾因子为 0.97, 连续进样 5 次, 重复性试验 RSD 均小于 2.0%, 均符合《中国药典》2010 年版规定。混合对照品溶液、供试品溶液和添加混合对照品溶液的供试品溶液的色谱图见图 1。

### 2.4 标准曲线的制备

避光操作。分别精密称取氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平对照品 26.55、20.23、24.65、23.72、28.13 mg, 加甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 溶解, 制成含氢氯噻嗪 531.0 μg/mL、盐酸

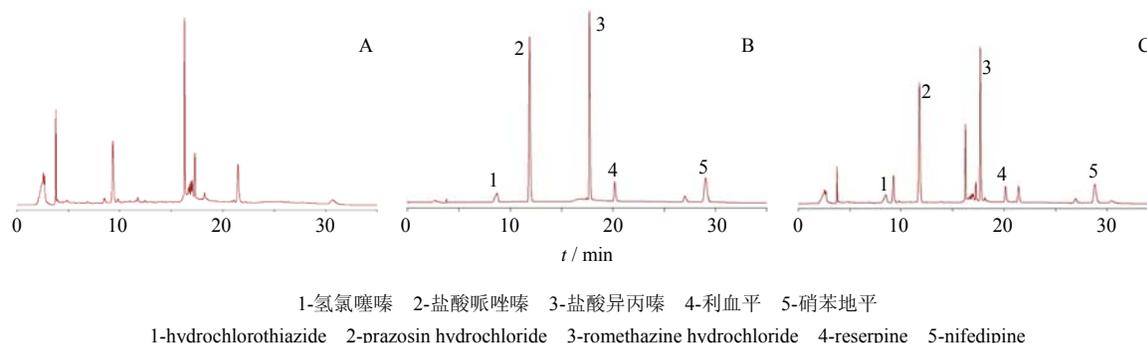


图 1 供试品 (A)、混合对照品 (B) 和添加混合对照品的供试品 (C) 的 HPLC 图

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

哌唑嗪 404.6  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸异丙嗪 493.0  $\mu\text{g/mL}$ 、利血平 474.4  $\mu\text{g/mL}$ 、硝苯地平 562.6  $\mu\text{g/mL}$  的溶液，作为对照品储备液。精密吸取各储备液，加甲醇制成系列浓度的混合对照品溶液。吸取系列浓度的混合对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ，注入液相色谱仪，依法测定，计算峰面积积分值 ( $A$ )，以进样量 ( $C$ ,  $\mu\text{g}$ ) 为横坐标， $A$  均值为纵坐标，得回归方程、相关系数分别为氢氯噻嗪： $A=742\ 033.061\ 6\ C-5\ 158.151\ 3$ ； $R^2=1.000\ 0$  ( $n=7$ )；盐酸哌唑嗪： $A=7\ 915\ 963.722\ 7\ C-18\ 011.913\ 6$ ； $R^2=1.000\ 0$  ( $n=7$ )；盐酸异丙嗪： $A=5\ 318\ 078.851\ 2\ C-11\ 963.115\ 7$ ； $R^2=1.000\ 0$  ( $n=7$ )；利血平： $A=905\ 053.723\ 1\ C-4\ 167.185\ 2$ ； $R^2=1.000\ 0$  ( $n=7$ )；硝苯地平： $A=1\ 770\ 098.555\ 4\ C-10\ 408.571\ 9$ ； $R^2=0.999\ 7$  ( $n=7$ )。结果表明氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平和硝苯地平分别在 21.24~2 124.0 ng ( $r=1.000\ 0$ )，16.184~1 618.4 ng ( $r=1.000\ 0$ )，19.72~1 972.0 ng ( $r=1.000\ 0$ )，18.976~1 897.6 ng ( $r=1.000\ 0$ ) 和 22.504~2 250.4 ng ( $r=1.000\ 0$ ) 范围内有良好线性关系。

### 2.5 精密度试验

精密吸取加入 5 种对照品的样品 (批号 081201) 溶液 20  $\mu\text{L}$ ，连续进样 6 次，测定  $A$  值的相对标准偏差 (RSD) 值。定量测定采用外标曲线法，结果氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平和硝苯地平峰面积的 RSD 值分别为 0.84%、0.30%、0.60%、0.73% 和 0.78%，表明本法精密度较好。

### 2.6 稳定性试验

实验避光操作。精密吸取加入 5 种对照品的样品 (批号 081201) 溶液，室温下放置，按上述方法分别于 0、1、2、4、10 h，测定其  $A$  值，结果氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平和硝苯地平峰面积的 RSD 值分别为 0.80%、0.43%、1.43%、0.17% 和 0.31%，测定结果表明，样品溶液在 10 h 内较稳定。

### 2.7 加样回收率试验

实验避光操作。取清脑降压片样品 (批号 081201) 6 份，每份约 0.3 g，精密称定。分别精密加入含氢氯噻嗪 106.2  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸哌唑嗪 80.9  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸异丙嗪 98.6  $\mu\text{g/mL}$ 、利血平 94.9  $\mu\text{g/mL}$ 、硝苯地平 112.5  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液 1.0 mL，置 50 mL 量瓶中，依法制成供试品溶液<sup>[6]</sup>。精密吸取含氢氯噻嗪 106.2  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸哌唑嗪 80.9

$\mu\text{g/mL}$ 、盐酸异丙嗪 98.6  $\mu\text{g/mL}$ 、利血平 94.9  $\mu\text{g/mL}$ 、硝苯地平 112.5  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液 2.5 mL，置 50 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，作为对照品溶液。分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ，注入液相色谱仪，依法测定，计算回收率。结果氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平和硝苯地平均回收率分别为 100.93% (RSD 为 1.52%， $n=6$ )、101.61% (RSD 为 1.21%， $n=6$ )、103.07% (RSD 为 1.08%， $n=6$ )、97.58% (RSD 为 0.73%， $n=6$ ) 和 96.36% (RSD 为 0.48%， $n=6$ )，表明本法的准确性较好。

### 2.8 检测限

实验避光操作。取混合对照品溶液，加甲醇稀释至适当质量浓度，按上述液相色谱方法，进样 2  $\mu\text{L}$ ，测定。得信噪比为 3 时各非法添加成分的检出限，氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平的最低检测限分别为 2.2、1.6、2.0、1.8、2.2 ng。

### 2.9 定量限

避光操作。取混合对照品溶液，加甲醇稀释至适当浓度，按上述液相色谱方法，进样 5  $\mu\text{L}$  测定。得信噪比为 10 时各非法添加成分的定量限，氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平的最低定量限分别为 5.5、4.0、5.0、4.5、5.5 ng。

### 2.10 样品测定

取 5 批不同生产企业和批号的清脑降压片，分别按“2.2”项下方法进行处理，按“2.1”项下条件测定，并采用外标曲线法计算各被测成分的量。测定结果为 5 批样品中均未检出非法添加的氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

在上述色谱条件下，精密吸取对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪，各色谱峰用 PDA 检测器在波长 200~400 nm 进行光谱扫描，盐酸异丙嗪的最大吸收波长在 251 nm，盐酸哌唑嗪的最大吸收波长在 246 nm，氢氯噻嗪、利血平和硝苯地平在 251 nm 波长处均有较大吸收，故选择 251 nm 作为 5 种降压类化学药物的 HPLC 检测波长<sup>[7]</sup>。

### 3.2 提取溶剂的选择

氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平在甲醇中溶解度较好，均比在水中溶解度更好，故选择甲醇作为供试品的提取溶剂。

### 3.3 流动相的选择

实验避光操作。取回收率试验的同一份供试品溶液,参照有关文献报道<sup>[8-9]</sup>,分别在流动相为不同比例、不同梯度的乙腈-0.2%磷酸水溶液进行不同比例的梯度洗脱,结果表明,选用前述梯度条件,氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平各峰峰形及分离度均较好,清脑降压片样品在相应位置上无干扰。按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪,进行测定,结果表明此流动相条件下样品基本无干扰。

### 3.4 色谱柱耐用性比较

运用不同品牌色谱柱,分别为岛津  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、大连依利特  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、APOLLO 色谱柱  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),取回收率试验的同一份供试品溶液<sup>[12]</sup>,进样 2 次测定,在样品色谱图上,氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平各峰在 35 min 内实验结果表明:岛津  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, ODS-SP, 5  $\mu\text{m}$ ) 与大连依利特  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱不适用于本法,APOLLO 色谱柱  $\text{C}_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 分离较好,可以运用于该实验。

### 3.5 柱温箱温度影响

取回收率试验的同一份对照品溶液,分别在柱温箱温度为 20、25、30、35、40  $^{\circ}\text{C}$  进样测定。样品色谱图上,在柱温箱温度为 20、25、30、35、40

$^{\circ}\text{C}$  时,氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、盐酸异丙嗪、利血平、硝苯地平各峰峰形及分离度均较好。其中,氢氯噻嗪、盐酸哌唑嗪、硝苯地平受柱温影响较大;盐酸异丙嗪、利血平受柱温影响较小。结果表明,本法适用的柱温箱温度 25~35  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 朱健,裘一婧,沈国芳. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健品中 13 种非法添加化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.
- [3] 励炯,沈国芳,朱建,等. UPLC-MS/MS 法测定风湿中成药中非法添加 8 种抗风湿性化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2647-2651.
- [4] 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 [S]. 2009032.
- [5] 程正,万庆,管玉云,等. HPLC 法测定复方利血平片中氢氯噻嗪、盐酸异丙嗪和利血平的含量 [J]. 安徽医药, 2010, 14(1): 38-40.
- [6] 彭芳玲,阳利龙,龙荣,等. HPLC 测定盐酸异丙嗪糖浆中盐酸异丙嗪的含量 [J]. 儿科药学杂志, 2008, 14(2): 24-26.
- [7] 张莉,田洪斌. HPLC 法测定复方利血平片中利血平的含量 [J]. 中国药事, 2008, 22(11): 997-1007.
- [8] 杨建林. 复方罗布麻片 II 中盐酸异丙嗪含量的 RP-HPLC 法测定 [J]. 安徽医药, 2009, 13(2): 164-165.
- [9] 刘桂丽. HPLC 法测定珍菊降压片中氢氯噻嗪和芦丁的含量 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [10] 娄志红,张秋生,姜连阁,等. HPLC 法测定氨酚异丙嗪注射液中盐酸异丙嗪的含量和有关物质 [J]. 中国药事, 2013, 27(11): 1207-1210.