

HPLC 法测定氢氯噻嗪原料药中有关物质

房思萌, 隋玉荣, 韩晓捷*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定氢氯噻嗪原料药中有关物质。方法 采用 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调 pH 值至 3.2) - 甲醇 - 四氢呋喃 (94:6:1), 流动相 B: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调 pH 值至 3.2) - 甲醇 - 四氢呋喃 (50:50:5); 梯度洗脱; 检测波长为 224 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C; 样品仓温度: 10 °C。结果 氢氯噻嗪、4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺、氯噻嗪线性范围分别为 0.030 06~6.011 00、0.030 01~6.002 00、0.030 08~6.015 00 μg/mL; 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺、氯噻嗪的平均回收率分别为 98.66%、99.17%, RSD 值分别为 1.53%、1.02%。结论 本法准确、可靠、专属性强, 可以控制氢氯噻嗪原料药中有关物质, 为质量标准提升提供参考。

关键词: 氢氯噻嗪; 有关物质; 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺; 氯噻嗪; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)09-1992-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.09.014

Determination of related substances in hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredients by HPLC

FANG Si-meng, SUI Yu-rong, HAN Xiao-jie

Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To develop a method for the determination of related substances in hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredients. **Methods** The analysis was performed on an Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase A was 0.02 mol/L potassium phosphate monobasic buffer (pH 3.2)-methanol-tetrahydrofuran (94:6:1), and the mobile phase B was 0.02 mol/L potassium phosphate monobasic buffer (pH 3.2)-methanol-tetrahydrofuran (50:50:5) with gradient elution. The detection wavelength was 224 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, injection volume was 20 μL, column temperature was 35 °C, and sample temperature was set as 10 °C. **Results** The calibration curve of hydrochlorothiazide, 4-amino-6-chlorobenzene-1,3-disulfonamide, and chlorothiazide were linear in the range of 0.030 06 — 6.011 00 μg/mL, 0.030 01 — 6.002 00 μg/mL, and 0.030 08 — 6.015 00 μg/mL. And the average recoveries were 98.66% and 99.17% and with RSD value of 1.53% and 1.02%, respectively. **Conclusion** The method is accurate, reliable, and specific for the determination of related substances in hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredients, which provides a reference for the improvement of quality standards.

Key words: hydrochlorothiazide; related substance; 4-amino-6-chlorobenzene-1,3-disulfonamide; chlorothiazide; HPLC

氢氯噻嗪又名双氢氯噻嗪, 为临床常用的噻嗪类利尿药和抗高血压药, 主要适用于心源性水肿、肝源性水肿、肾源性水肿以及肾上腺皮质激素与雌激素过多引起的水肿, 也可用于高血压、尿崩症^[1-2]。该药物降压效果确切, 与其他抗高血压药物联合应用能显著增加疗效, 有良好的心脑血管保护作用, 费用低廉, 依从性好, 为降压治疗的起始药和

维持药^[3-4]。《中国药典》2020 年版二部收载了氢氯噻嗪及其片剂的质量标准^[5], 但有关物质方法还不够完善, 杂质 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺和氯噻嗪尚未作为已知杂质进行定量控制, 由于该杂质为氢氯噻嗪的主要降解杂质之一, 其定量研究显得尤为重要。现行的《欧洲药典》^[6]、《英国药典》^[7]、《美国药典》^[8]均收载了氢氯噻嗪, 并将 4-氨基-6-氯-1,3-

收稿日期: 2022-06-04

作者简介: 房思萌 (1987—), 女, 副研究员, 硕士, 主要从事药品检验工作。E-mail: fangsimeng521@163.com

*通信作者: 韩晓捷 (1980—), 女, 天津人, 主管药师, 从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: hxjtdc@163.com

苯二磺酰胺作为已知杂质进行控制,明确了其限度。文献报道中有对氢氯噻嗪复方制剂中有关物质测定的研究^[9-12],但针对氢氯噻嗪原料药中有关物质研究的报道较少。氢氯噻嗪较易产生杂质,需对氢氯噻嗪原料药产品进行更加严格的控制,减少杂质带入下游的制剂产品中。本实验采用高效液相色谱法对氢氯噻嗪中有关物质进行了方法学研究,本法准确、可靠、专属性强,可以控制氢氯噻嗪原料药中有关物质,为其质量标准的提升提供参考。

1 仪器与试药

Waters e2695 高效液相色谱仪,配备 PDA 二极管阵列紫外检测器,梅特勒托利多 XS205 十万分之一电子天平。氢氯噻嗪对照品(批号 100309-201404,质量分数 99.7%,中国食品药品检定研究院);4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺对照品(批号 1057507,质量分数 99.9%,《美国药典》标准品);氯噻嗪对照品(批号 101129-201903,质量分数 99.8%,中国食品药品检定研究院);氢氯噻嗪原料药(批号为 211104、211105、211106)购自常州制药厂有限公司。甲醇、四氢呋喃为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 值至 3.2)-甲醇-四氢呋喃(94:6:1),流动相 B: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 值至 3.2)-甲醇-四氢呋喃(50:50:5);梯度洗脱(0~22.5 min,流动相 A 从 100%降至 55%;22.5~45 min,流动相 A 保持 55%;45~52.5 min,流动相 A 从 55%增加至 100%);检测波长为 224 nm;体积流量为 1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱

温:35℃;样品仓温度:10℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取氢氯噻嗪、氯噻嗪和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺对照品各 15 mg,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解并分别制成 0.3 mg/mL 的对照品贮备液。分别精密量取氯噻嗪、4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺对照品贮备液适量,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释,分别制成 3 μg/mL 的杂质定位液。

2.2.2 系统适用性溶液的制备 分别取氢氯噻嗪、氯噻嗪对照品贮备液各 1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至刻度,即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 分别取氢氯噻嗪、氯噻嗪和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺对照品贮备液 1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至刻度,即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密称取氢氯噻嗪原料药 15 mg,置 50 mL 量瓶中,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解并稀释至刻度,即得。

2.3 专属性和系统适用性试验

分别取溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)、氯噻嗪杂质定位液、4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺定位液、系统适用性溶液、混合对照品溶液和供试品溶液,进样测定,记录色谱图。结果溶剂不干扰有关物质的测定,氢氯噻嗪与氯噻嗪的分离度为 4.0,主峰与相邻峰的分离度符合要求,理论塔板数按氢氯噻嗪计为 12 000,符合要求。色谱图见图 1。

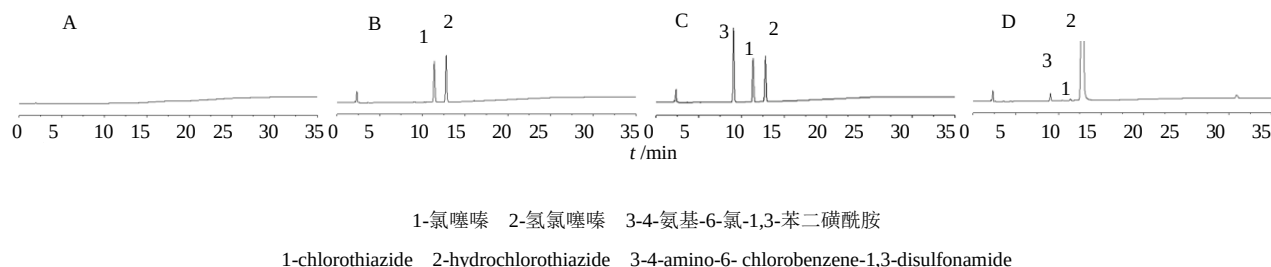


图 1 溶剂(A)、系统适用性溶液(B)、混合对照品溶液(C)、氢氯噻嗪原料药(D)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of solvent (A), system suitability solution (B), mixed reference substances (C), and hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredients (D)

2.4 线性关系和校正因子考察

精密称取氢氯噻嗪、4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺和氯噻嗪对照品适量,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释成 6.00、3.00、1.50、0.60、0.30、0.03 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,进样测定,记录色谱图,以峰面积对质量浓度进行

线性回归,计算回归方程,用标准曲线法计算杂质校正因子,见表 1。可见氢氯噻嗪及其杂质在 0.03~6.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好,氯噻嗪和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺的校正因子超出 0.9~1.0,有关物质检查项下已知杂质可以按杂质对照品外标法计算,也可按加校正因子的主成分外标法计算。

表 1 线性关系和校正因子
Table 1 Linear relationship and correction factor

成分	线性方程	r	浓度范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	校正因子
氢氯噻嗪	$Y=138\ 152\ X-235.9$	1.000 0	0.030 06~6.011 00	
氯噻嗪	$Y=116\ 845\ X+98.3$	0.999 9	0.030 08~6.015 00	1.18
4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺	$Y=166\ 749\ X-456.5$	0.999 9	0.030 01~6.002 00	0.83

2.5 定量限和检测限

取混合对照品溶液,用溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至信噪比约为 10:1 相对应的质量浓度,为定量限试验溶液;用溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至信噪比约为 3:1 相对应的质量浓度,为检出限试验溶液,测得的氢氯噻嗪、4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺和氯噻嗪的定量限均为 0.6 ng,检测限均为 0.2 ng。

2.6 强制降解试验

2.6.1 溶液降解 取氢氯噻嗪原料药 15 mg,置 50 mL 量瓶中,在不同条件下进行强制降解试验。(1)溶液加热降解:加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)适量溶解,60 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 h,放冷,加溶剂定容;(2)酸降解:加 1 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL,室温放置 1 h,再加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.2 mL 中和,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至刻度;(3)碱降解:加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 0.2 mL,室温放置 1 h,再加 1 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL 中和,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至刻度;(4)氧化降解:加 30%过氧化氢溶液 0.2 mL,室温放置 1 h,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)稀释至刻度;(5)溶液光照降解:加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解,并稀释至刻度,置于(4500 $\pm$ 500) lx 白光光照条件下 48 h。

2.6.2 固态降解 (1)高温:取氢氯噻嗪原料药适量,置 100 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中 2 h 后取出,放至室温,精密

称取 15 mg 置 50 mL 量瓶中,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解并稀释至刻度;(2)高湿:取氢氯噻嗪原料药 15 mg,置 50 mL 量瓶中,置相对湿度 92%条件下 48 h 后取出,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解并稀释至刻度;(3)白光光照:取氢氯噻嗪原料药 15 mg,置 50 mL 量瓶中,置白光光照(4500 $\pm$ 500) lx 条件下 48 h 后取出,加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液(1:1:6)溶解,并稀释至刻度。

2.6.3 结果 供试品溶液在酸、碱、氧化条件下均未发生显著的降解,但在 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热条件下,主峰降解可达 16%,主要降解杂质为 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺(约增加 14%);在溶液白光光照 48 h 后,主成分降解约 7%,主要降解杂质为保留时间 7.1 min 的未知杂质(约增加 5%)、氯噻嗪(约增加 1%)和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺(约增加 0.5%);固态高温、高湿、光照均发生少量降解(其中主成分降解<2%)。降解物增加量与主成分减少量一致,检测峰面积计算得到物料平衡,证明采用的梯度高效液相色谱法对降解杂质能够有效地分离和检测,能够灵敏、定量准确地测定氢氯噻嗪原料药中的降解杂质,为氢氯噻嗪原料药的降解规律研究提供保证,为后续制剂研究提供稳定性参考。

2.7 重复性试验

取批号 211106 氢氯噻嗪原料药,平行配制 6 份供试品溶液,进样测定,记录色谱图,计算得 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺、氯噻嗪的峰面积的 RSD 值分别为 1.66%、1.89%。

2.8 稳定性试验

分别取新配制的混合对照品溶液和批号 211106 氢氯噻嗪原料药供试品溶液, 分别于 10 °C 样品仓条件下放置 0、2、4、8、12、24、48、96 h, 进样测定, 结果混合对照品溶液中氢氯噻嗪、氯噻嗪和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺的峰面积 RSD 值分别为 0.35%、0.24%、0.46%; 供试品溶液放置 8 h 时, 氢氯噻嗪、氯噻嗪和 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺的峰面积 RSD 值分别为 0.30%、1.94%、1.82%; 放置 12 h 时, 各杂质的峰面积 RSD 值均超过 2.0%, 说明供试品溶液配制和检测过程需在 8 h 内完成。

2.9 回收率试验

精密称取批号 211106 氢氯噻嗪原料药 30 mg, 加溶剂乙腈-甲醇-pH 3.2 的磷酸盐缓冲液 (1:1:6) 适量溶解, 分别精密加入 0.3 mg/mL 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺对照品溶液以及氯噻嗪贮备液 0.1、0.5、0.75 mL, 各 3 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。按照外标法计算得 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺、氯噻嗪的平均回收率分别为 98.66%、99.17%, RSD 值分别为 1.53%、1.02%。

2.10 耐用性试验

分别考察了高效液相色谱系统参数变化和样品制备系统参数变化的耐用性。高效液相色谱系统参数考察包括梯度时间 $\pm 10\%$ 、流动相 pH 值 ± 0.2 、体积流量 ± 0.1 mL/min、柱温 ± 2 °C。各条件下系统适用性试验符合要求, 各杂质测定结果 RSD 值小于 10%, 未知杂质总量 RSD 值小于 10%, 色谱图杂质谱特征一致, 色谱系统耐用性良好。

2.11 样品测定

准确量取氢氯噻嗪原料药供试品溶液、混合对照品溶液各 20 μ L, 分别进样, 记录色谱图。供试品溶液色谱图记录至主峰保留时间的 2.5 倍。供试品溶液色谱图中, 如有保留时间与对照品溶液相应的杂质峰, 按外标法以峰面积计算杂质的量, 其他杂质按主成分外标法计算, 结果见表 2。

表 2 氢氯噻嗪原料药中有关物质的测定结果

Table 2 Determination of related substances in hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredients

批号	4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺/%	氯噻嗪/%
211104	0.09	—
211105	0.18	0.03
211106	0.14	0.02

按《中国药典》2020 年版氢氯噻嗪中有关物质的限度规定: 供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 单个杂质峰面积不得大于对照峰面积 (0.5%), 各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍 (1.0%)。色谱图中任何小于对照溶液主峰面积 0.1 倍 (0.05%) 的峰可忽略不计。3 批氢氯噻嗪原料药样品的测定结果均符合规定。

3 讨论

参考各国药典^[5-8]分别考察了 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m)、Waters Sunfire C₁₈ (50 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μ m) 色谱柱和 Welch Ultimate C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 3 种色谱柱, 所得图谱显示主峰与氯噻嗪以及其他相邻杂质的分离度均符合要求, 方法适用性较强。

有关物质检查溶液稳定性考察表明, 氢氯噻嗪原料药供试品溶液于 10 °C 条件下放置 8 h, 杂质 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺峰明显增大, 于室温条件下稳定性更差, 故本品尽量临用现配。目前该杂质无法在中国食品药品检定研究院采购到, 国内也难以获得, 均从国外官方或第三方采购, 成本较高, 可通过多次试验计算得到准确的校正因子, 采用加校正因子的主成分外标法进行计算。

氢氯噻嗪原料药现行标准虽然在检验项目、检验方法和限度等方面基本能够控制质量, 但通过各国药典的综合对比, 建议持续提高其质量标准, 针对主要降解杂质进行定量控制, 并明确其限度。本研究对氢氯噻嗪原料药中已知杂质 4-氨基-6-氯-1,3-苯二磺酰胺进行了全面的方法学研究, 为氢氯噻嗪原料药及其制剂的质量控制提供了更全面的分析方法, 并为其质量标准的提升提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨国伟, 李青翠, 陈煜, 等. 氢氯噻嗪片质量分析 [J]. 药物分析杂质, 2011, 31(10): 1877-1879.
- [2] 夏洋. 氢氯噻嗪的药理作用及不良反应分析 [J]. 航空军医, 2018, 38(1): 124-126.
- [3] 李强, 沈丽霞, 李明春, 等. 抗高血压药物噻嗪类利尿剂应用新进展 [J]. 中国药业, 2021, 30(19): 1-4.
- [4] 丁淑红. 厄贝沙坦联合氢氯噻嗪对老年原发性高血压患者的作用探究 [J]. 甘肃科技, 2022, 38(1): 106-108.
- [5] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 936-937.
- [6] 欧洲药典 [S]. EP10.8: 2879-2881.
- [7] 英国药典 [S]. BP2022.
- [8] 美国药典 [S]. USP-NF2022 ISSUE1.

- [9] 赵翠, 徐宝燕, 兰公剑. HPLC 法测定复方制剂厄贝沙坦氢氯噻嗪片有关物质 [J]. 辽宁化工, 2022, 51(1): 146-148.
- [10] 李浩贤, 林华庆, 李俊健, 等. 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 [J]. 中国药房, 2020, 31(7): 825-830.
- [11] 魏宁漪, 周颖, 陈翠翠, 等. HPLC 法测定依那普利氢氯噻嗪片的有关物质 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(17): 1999-2005.
- [12] 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.

【责任编辑 解学星】