

文章编号 1006-8147(2016)01-0080-04

论 著

复方呋塞米螺内酯胶囊质量控制方法的研究

上官可可¹, 李美珍², 杨金荣², 房志仲²

(1.天津医科大学第二医院药剂科, 天津 300211; 2.天津医科大学药学院药剂学教研室, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的: 建立复方呋塞米螺内酯胶囊(FuSpirC)的质量控制方法。方法: 用高效液相色谱法测定复方制剂中呋塞米和螺内酯的含量。结果: 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇: 0.02 mol/L 磷酸二氢钾(67:33)(0.85%磷酸调节 pH 至 4.3), 流速 0.8 mL/min, 检测波长为 239 nm, 呋塞米、螺内酯分别在 5~35 μg/mL、20~80 μg/mL 浓度范围线性关系良好, 呋塞米平均回收率分别为 98.29%(RSD=0.08%, n=3)、99.20%(RSD=0.48%, n=3)、99.18%(RSD=0.36%, n=3), 螺内酯平均回收率分别为 101.76%(RSD=0.13%, n=3)、101.35%(RSD=0.52%, n=3)、101.67%(RSD=0.27%, n=3), 平均回收率的 RSD 均小于 2%, 符合方法学要求, 呋塞米、螺内酯平均含量分别为 94.79%、99.76%, 均符合要求。结论: 所建立方法可用于复方呋塞米螺内酯胶囊的质量控制。

关键词 呋塞米; 螺内酯; 高效液相色谱法; 质量控制

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

Study of the quality control of the compound furosemide and spironolactone capsules

SHANGGUAN Ke-ke¹, LI Mei-zhen², YANG Jin-rong², FANG Zhi-zhong²

(1. Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To develop a method for controlling the quality of compound FuSpirC. **Methods:** High performance liquid chromatography was used to determine the contents of furosemide and spironolactone in compound FuSpirC. **Results:** Column was represented by Kromasil-C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol: 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (67:33) (used 0.85% phosphoric acid adjust pH 4.3), flow rate 0.8 mL/min, detected wavelength was 239 nm, the concentrations of furosemide and spironolactone were 5~35 μg/mL and 20~80 μg/mL, respectively, and were in good linear relationship. The average recovery rate of furosemide were 98.29% (RSD = 0.08%, n=3), 99.20% (RSD = 0.48%, n=3), 99.18% (RSD = 0.36%, n=3), while spironolactone were 101.76% (RSD = 0.13%, n=3), 101.35% (RSD = 0.52%, n=3), 101.67% (RSD = 0.27%, n=3), the average recovery of RSD was less than 2%, conformed to the requirement of the methodology. The content of furosemide and spironolactone were 94.79% and 99.76%, conformed to the requirements. **Conclusion:** The methods can be used for quality control of compound FuSpirC.

Key words furosemide; spironolactone; HPLC; quality control

呋塞米为强效利尿剂, 其作用机制主要是抑制肾小管髓袢升支粗段髓质部 Na⁺、Cl⁻的主动再吸收, 因而尿中 Na⁺、K⁺与水的排出增加而产生利尿作用^[1]。此外, 还有扩张肾小动脉的作用。长期或大剂量应用, 可引起低钾血症、低钠血症和代谢性酸中毒。严重时因血容量降低, 导致休克甚至死亡^[2]。螺内酯为人工合成的类固醇类药物, 其结构与醛固酮类似, 两者在肾远曲小管和集合管的皮质段起竞争作用, 干扰醛固酮保钠排钾的作用, 对伴有醛固酮增高的顽固水肿有治疗作用, 且可防止钾的耗竭,

在临床上有重要用途^[3], 对心力衰竭也有一定的疗效^[4]。单独应用效力较弱, 一般需与噻嗪类或呋塞米等合用, 方可取得显著利尿作用, 并可抵消相互引起的低钾血症^[5-6]。有研究显示呋塞米螺内酯联用可安全有效的治疗轻中度原发性高血压, 有良好的耐受性, 并且副作用小, 不引起血糖、血脂代谢和血清中钾、尿酸浓度的变化^[7]。根据文献, 笔者研制该复方制剂胶囊, 并建立相应质控方法。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 高效液相色谱仪 (美国 Spectra-physic、Spectra Focus 紫外检测器、输液泵、Anstar 色谱工作站); ZDY-II-1 IKVA 高精密度单相交流

作者简介 上官可可 (1989-), 男, 硕士在读, 研究方向: 临床药理学; 通信作者: 房志仲, E-mail: fangzhizhong@tmu.edu.cn。

稳压电源(国营启东电讯厂);pHS-25(数显)pH计(Q/YXLG122,上海精密科学仪器有限公司);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ALC-210.4电子分析天平(ACCULAB Sartorius group,北京赛多利斯仪器系统有限公司);U3310紫外可见分光光度计(Spectrophotometer Hitachi; High-Techrolgies Corporation)。

1.1.2 试剂与药品 呋塞米标准品(中国药品生物制品检定所,100544-200501);螺内酯标准品(中国药品生物制品检定所,100193-201102);FuSpirC制剂(自制,3批);甲醇(天津市康科德科技有限公司,色谱纯);其它试剂均为市售分析纯;重蒸水(自制)。

1.2 方法^[8]

1.2.1 检测波长 以甲醇分别溶解呋塞米、螺内酯原料药到适当浓度,按分光光度法在200~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,并扫描呋塞米螺内酯适当浓度的混合样品,以确定检测波长。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为TIANHE® Kromasil C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 甲醇-0.02 mol/L磷酸二氢钾=67:33(用0.85%磷酸调节pH至4.3);检测波长:239 nm;流速:0.8 mL/min;柱温:室温;进样量:20 μL。

1.2.3 专属性试验 分别以流动相作溶剂,配制复方FuSpirC胶囊制剂溶液,呋塞米原料药溶液、螺内酯原料药溶液及空白辅料溶液。将所配溶液按照确定色谱条件进行测定,记录色谱图。

1.2.4 复方FuSpirC含量测定方法

1.2.4.1 溶液的制备:(1)对照品溶液的制备:呋塞米标准储备液的配制:精密称取呋塞米标准品20 mg置于100 mL棕色量瓶中,用适量甲醇超声溶解,用甲醇稀释定容,摇匀作为贮备液。螺内酯标准储备液的配制:精密称取螺内酯标准品50 mg置于50 mL量瓶中,用适量甲醇超声溶解,用甲醇稀释定容,摇匀作为贮备液。(2)样品溶液的制备:取自制FuSpirC胶囊10粒,取出内容物,研细,精密称取适量(相当于呋塞米20 mg、螺内酯50 mg),置于100 mL棕色容量瓶中,加适量甲醇超声溶解,冷却,定容,取适量离心,精密吸取上清液1.0 mL置于10 mL棕色量瓶中,用流动相稀释定容,备用。(3)空白对照液的制备:称取处方中辅料,置量瓶中,以下操作同“1.2.4.1(2)”项下。

1.2.4.2 标准曲线的制备:呋塞米标准曲线的绘制:分别精密量取“1.2.4.1项下”呋塞米储备液0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50和1.75 mL置于10 mL棕色量瓶中,用流动相稀释定容,摇匀,于色谱条件下

进行测定。螺内酯标准曲线的绘制:分别精密量取“1.2.4.1项下”螺内酯储备液0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70和0.80 mL置于10 mL量瓶中,用流动相稀释定容,摇匀,按照“1.2.2”项下色谱条件进行测定,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,做线性回归。1.2.4.3 精密度试验:取“1.2.4.1”溶液,按照“1.2.2”项下色谱条件平行进样6次,分别计算呋塞米、螺内酯RSD值。

1.2.4.4 稳定性试验:精密称取样品,按照“1.2.4.1(2)”项下方法操作,分别于0、3、6、9、12和24 h,按照“1.2.2”项下色谱条件进样,计算RSD值。

1.2.4.5 重复性试验:分别量取供试品溶液6份,按照“1.2.4.1(2)”项下操作,按照“1.2.2”项下色谱条件,各取20 μL进样,测定峰面积。

1.2.4.6 回收率试验:呋塞米回收率试验:取空白辅料70 mg,置于50 mL棕色量瓶中,分别按照80%、100%和120%的量,加入呋塞米标准品4、5和6 mg,加适量甲醇超声10 min,放冷至室温,甲醇稀释定容,摇匀,取适量离心,精密吸取上清液1.0 mL置于10 mL棕色量瓶中,用流动相稀释定容,摇匀,进样测定。螺内酯回收率试验:取空白辅料62.5 mg,置于50 mL量瓶中,分别按照80%、100%、120%的量,加入螺内酯标准品10、12.5、15 mg,加适量甲醇超声使溶解,甲醇稀释定容,摇匀,取适量离心,精密吸取上清液1.0 mL置于10 mL量瓶中,用流动相稀释定容,摇匀,按照“1.2.2”项下色谱条件进样测定。

1.2.4.7 含量测定:取10粒胶囊,倾出内容物,研细称取适量(相当于呋塞米5 mg、螺内酯12.5 mg)3份,分别置于50 mL棕色量瓶中,加适量甲醇超声10 min,放冷至室温,加甲醇稀释定容,摇匀,取适量离心,精密吸取上清液1.0 mL置于10 mL棕色量瓶中,用流动相稀释定容,摇匀,按照“1.2.2”项下色谱条件进样测定。

2 结果

2.1 检测波长的选择 呋塞米甲醇溶液、螺内酯甲醇溶液、呋塞米螺内酯(FL)混合样甲醇溶液分别做紫外全波长扫描,记录吸光度图谱,见图1。呋塞米、螺内酯在239 nm左右处均有最大吸收波长,故选择239 nm作为HPLC检测波长。

2.2 专属性试验结果 呋塞米的保留时间为4 min,螺内酯保留时间为13 min,空白对照液色谱图中与对照品相同保留时间处无干扰,表明辅料不干扰样品测定。见图2~5。

2.3 线性关系考察结果 呋塞米在5~35 μg/mL范围内与峰面积成良好线性关系。其标准曲线方程

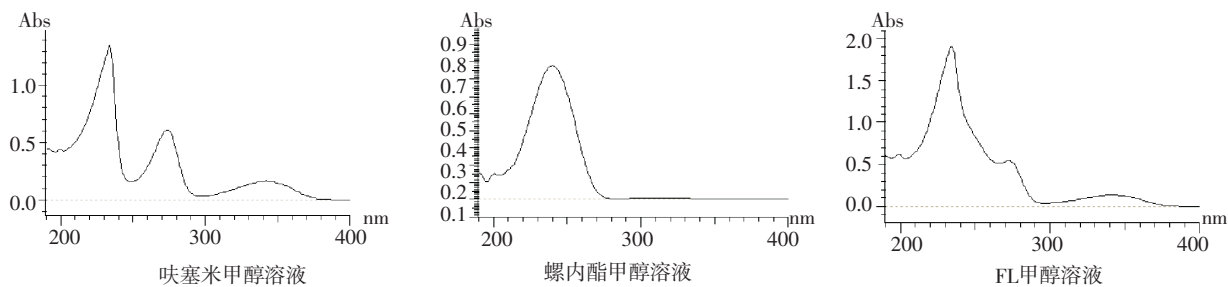


图1 溶液 200~400 nm 波长紫外扫描结果

Fig 1 UV spectrum of solutions (200~400 nm)

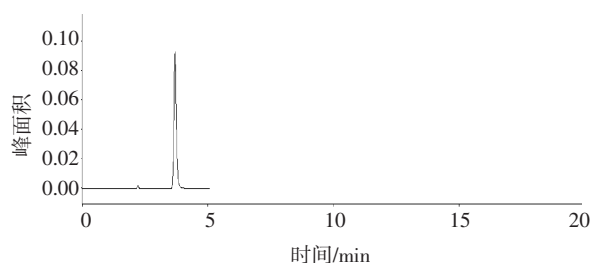


图2 呋塞米原料药 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of furosemide

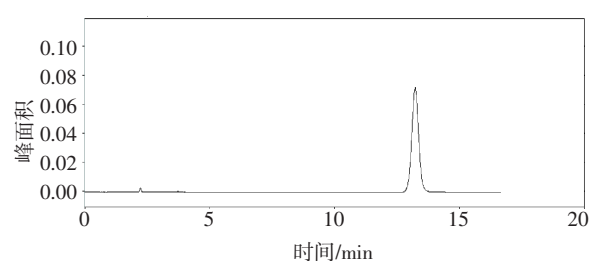


图3 螺内酯原料药 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of spironolactone

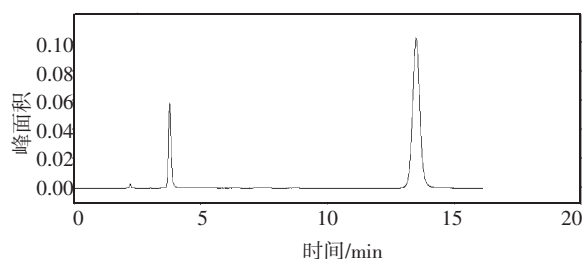


图4 复方 FuSpirC 胶囊 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of compound FuSpirC

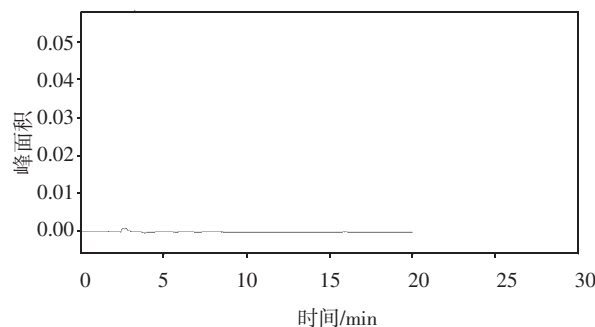


图5 空白辅料 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of blank excipients

为: $y=41\,286x+20\,838$, $r=0.999\,9$ ($n=7$); 螺内酯在 20~80 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积成良好线性关系。其标准曲线方程为: $y=69\,185x-29\,778$, $r=0.999\,7$ ($n=7$)。

2.4 精密度的试验结果 呋塞米、螺内酯 RSD 分别为 0.46%、0.34%, 均 $RSD < 2\%$, 表明该测定方法精密度良好。

2.5 稳定性试验结果 呋塞米、螺内酯 RSD 分别为 1.03%、0.89%, 均 $RSD < 2\%$ 。实验结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定, 能满足试验要求。

2.6 重复性试验结果 供试品中呋塞米含量 RSD 为 0.56%; 螺内酯含量 RSD 为 0.48%, 本试验重复性较好。

2.7 回收率试验结果 呋塞米平均回收率分别为 98.29% ($RSD=0.08\%$, $n=3$), 99.20% ($RSD=0.48\%$, $n=3$), 99.18% ($RSD=0.36\%$, $n=3$); 螺内酯平均回收

率分别为 101.76% ($RSD=0.13\%$, $n=3$), 101.35% ($RSD=0.52\%$, $n=3$), 101.67% ($RSD=0.27\%$, $n=3$), 平均回收率的相对标准偏差均小于 2%, 符合方法学要求。见表 1、2。

表1 呋塞米回收率测定结果

Tab 1 Recovery test on furosemide

加样率/%	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
80	4	3.93	98.20	98.29	0.08
	4	3.93	98.27		
	4	3.94	98.39		
100	5	4.94	98.84	99.20	0.48
	5	4.94	98.89		
	5	4.99	99.87		
120	6	5.93	98.88	99.18	0.36
	6	5.94	98.99		
	6	5.98	99.68		

表 2 螺内酯回收率结果

Tab 2 Recovery test on spironolactone

加样率/%	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
80	10	10.18	101.81	101.76	0.13
	10	10.16	101.57		
	10	10.19	101.89		
100	12.5	12.74	101.94	101.35	0.52
	12.5	12.68	101.43		
	12.5	12.58	100.67		
120	15	15.28	101.84	101.67	0.27
	15	15.19	101.29		
	15	15.28	101.89		

2.8 含量测定结果 呋塞米平均含量为 94.79%, 在 90%~110%范围,符合《中国药典》2010 版(二部)中对呋塞米的质量要求,其 *RSD* 为 0.78%, 小于 2%, 符合质量标准规定;螺内酯平均含量为 99.76%,在 97%~103%范围,符合《中国药典》2010 版(二部)中对螺内酯的质量要求,其 *RSD* 为 0.66%,小于 2%,符合质量标准规定。见表 3~4。

表 3 呋塞米含量测定结果

Tab 3 The content of furosemide in FuSpirC

次数	峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	441 441	94.01	94.79	0.78
2	449 574	95.75		
3	444 248	94.61		

表 4 螺内酯含量测定结果

Tab 4 The content of spironolactone in FuSpir

次数	峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	1 754 906	99.87	99.76	0.66
2	1 765 780	100.49		
3	1 738 201	98.92		

3 讨论

《中国药典》2010 年版(二部)中对呋塞米的含量测定为滴定法,螺内酯的含量测定选用的色谱条件为乙腈-水(50:50)^[9-10],当选用乙腈-水(50:50)为流动相时,呋塞米与螺内酯分离度差。有文献报道采用甲醇-水(70:30)^[11]、0.02 mol/L 磷酸氢二铵-乙腈(45:55)^[12]为流动相测定螺内酯,但用此 2 种流动

相时螺内酯与呋塞米分离度均不佳,调节比例后仍然未见改善。另有相关文献报道呋塞米含量测定以甲醇-水-磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 13.6 g 加水 80 mL 使溶解,用磷酸调节 pH 值至 3.0,用水稀释至 1 000 mL)(500:493:7)为流动相,但此流动相在试验过程中呋塞米、螺内酯出峰时间较晚。调节流动相比例、流速,当甲醇-水-磷酸盐缓冲液比例为 670:300:30,流速为 0.8 mL/min 时,呋塞米、螺内酯出峰时间适中且峰形良好,但发现流动相在放置过程中有磷酸盐析出。为使流动相配制简便,调整流动相为甲醇:0.02 mol/L 磷酸二氢钾,调节其比例至 67:33,流速为 0.8 mL/min 时,螺内酯峰形不佳,用 0.85%磷酸调节流动相 pH 至 4.3 时,峰形良好,塔板数和分离度均符合要求,故最终确定流动相为甲醇:0.02 mol/L 磷酸二氢钾(0.85%磷酸调节 pH 至 4.3),流速为 0.8 mL/min。

参考文献:

- [1] 李艳平. 几种常见利尿、脱水药使用方法及不良反应[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(14):74
- [2] 马艳华. 呋塞米的临床新用途[J]. 黔南民族医学学报, 1998(2):26
- [3] 张石革, 孙定人. 新药临床药理和选用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001:414-414
- [4] 刘刚, 籍振国, 刘坤申. 螺内酯治疗老年高血压舒张性心力衰竭的疗效[J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(8):567
- [5] 张芳, 张兴元, 张洁, 等. 醛固酮拮抗剂临床应用的研究[J]. 滨州医学院学报, 2010, 33(5):378
- [6] 贺秀玲. 浅谈螺内酯的新用途[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(23):286
- [7] Birbari A E, Daouk M M, Mukaddam-Daher S. Efficacy and safety of lasilactone, a new combination diuretic, in essential hypertension[J]. Gen Pharmacol, 1987, 18(6):609
- [8] 陈庆伟, 陈华锋. 高效液相色谱法测定螺内酯片的含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(2):54
- [9] 李超, 张勉. HPLC 法测定螺内酯片的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(17):1610
- [10] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:244
- [11] 王菊荣, 王月军, 叶勇, 等. HPLC 法测定复方药物微乳膏中螺内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12):1883
- [12] 孔爱英, 钟琼. 高效液相色谱法测定螺内酯片的含量[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(4):272

(2015-07-29 收稿)