

RP-HPLC 测定羟苯磺酸钙含量及有关物质

于梦, 刘文乔, 高瑞芳, 王忠元, 赵怀清*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:** 建立反相高效液相色谱法测定羟苯磺酸钙原料药的含量及其有关物质。**方法:** 采用 C_8 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液-乙腈 (90:10) 为流动相等度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 进样体积 20 μL。**结果:** 含量测定色谱条件下, 羟苯磺酸钙质量浓度在 20.0 ~ 200.0 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9995$), 平均回收率 99.4%; 有关物质项下杂质氢醌的含量分别为 0.018%, 0.023%, 0.021%, 杂质总量分别为 0.16%, 0.18%, 0.13%。**结论:** 方法简便、快速, 可用于羟苯磺酸钙原料药的含量测定及有关物质的检查。

[关键词] 羟苯磺酸钙; 氢醌; 有关物质; 含量测定; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0152-05

[doi] 10.11653/syfyj2013170152

Determination of Calcium Dobesilate and its Related Substances by RP-HPLC

YU Meng, LIU Wen-qiao, GAO Rui-fang, WANG Zhong-yuan, ZHAO Huai-qing*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of the content and related substance of calcium dobesilate. **Method:** The separation was performed on a Kromasil C_8 column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate monobasic-acetonitrile (90:10); the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The injection volume was 20 μL and the determination wavelength was set at 220 nm. The column temperature was 35 °C. **Result:** Using this method, calcium dobesilate and its related substances could be absolutely separated. For the content determination, a linearity between the area of calcium dobesilate and its concentration was achieved in the range of 20.0-200.0 mg·L⁻¹ ($r = 0.9995$). The average recovery was 99.4%. The content of total impurities was 0.16%, 0.18%, 0.13% respectively. The special impurity was 0.018%, 0.023%, 0.021% respectively. **Conclusion:** The method was simple, efficient and accurate for analyzing the related substances and content of calcium dobesilate.

[Key words] calcium dobesilate; hydroquinone; related substances; content determination; RP-HPLC

羟苯磺酸钙, 化学名为 2,5-二羟基苯磺酸钙水合物, 是一种改善微循环的血管保护剂, 主要用于各种原因引起的毛细血管疾病, 对糖尿病导致的视网

膜病变有明显抑制和逆转作用^[1-6]。为保证药品质量和临床用药的安全有效, 有必要对原料药的质量进行有效控制^[7-8]。《中国药典》^[9] 及《欧洲药典》^[10] 均采用铈量滴定法测定羟苯磺酸钙原料药的含量, 在利用 HPLC 进行有关物质检查时均采用 C_{18} 色谱柱。参考文献 [11] 和 [12] 报道了方法, 但羟苯磺酸钙的极性较强, 在 C_{18} 色谱柱上保留时间较短, 因此考虑使用极性较大的 C_8 色谱柱。本文首次建立了使用 C_8 色谱柱测定羟苯磺酸钙含量及有关物质的反相高效液相色谱法, 方法未见文献报道。

[收稿日期] 20121123(005)

[第一作者] 于梦, 硕士研究生, 从事药物质量控制研究, Tel: 13478303452, E-mail: yumeng_spu@sina.cn

[通讯作者] * 赵怀清, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制方法和药动学研究, Tel: 024-23986556, E-mail: zhaohq1955@sina.com

1 材料

LC-10AT VP-UV 高效液相输液泵、SPD-10Avp 紫外检测器(日本 Shimadzu 公司), LC-Solution 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司), HT-230A 柱温箱(天津恒奥公司), BS124S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), HB-III 型循环水式真空泵(郑州长城科公贸有限公司), KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

羟苯磺酸钙对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100573-201002,按无水物与无水溶剂算含 $C_{12}H_{10}CaO_{10}S_2$ 95.0%), 氢醌对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100221-200301,含量 100.0%), 羟苯磺酸钙原料药(某企业提供,批号 20111202, 20111203, 20111204), 乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司), 重蒸水, 磷酸二氢钠(分析纯,西陇化工股份有限公司), 盐酸(分析纯,沈阳市经济技术开发区试剂厂), 30% 过氧化氢溶液(分析纯,沈阳市东陵区红日化工厂), 氢氧化钠(分析纯,天津市博迪化工有限公司)。

2 方法与结果

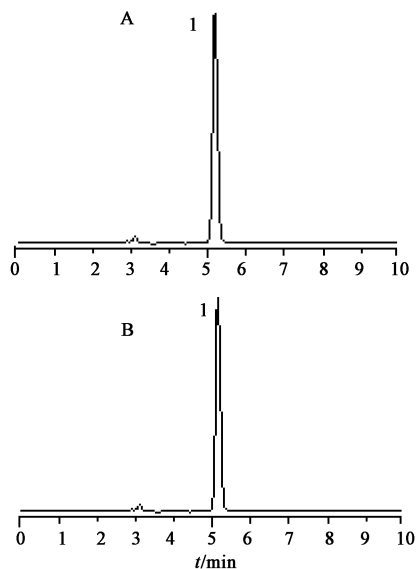
2.1 羟苯磺酸钙的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性 大连依利特 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相 50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液-乙腈(90:10), 柱温 35 °C, 检测波长 220 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样体积 20 μL。取对照品、供试品溶液进样测定, 色谱图见图 2。理论塔板数按羟苯磺酸钙色谱峰计算不低于 5 000, 羟苯磺酸钙色谱峰与相邻峰的分度符合要求。

2.1.2 溶液的制备(避光操作) 对照品溶液: 精密称取羟苯磺酸钙对照品约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得羟苯磺酸钙约为 100 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液: 精密称取羟苯磺酸钙原料药约 0.1 g, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL 至 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得羟苯磺酸钙约为 100 mg·L⁻¹ 的供试品溶液。

2.1.3 线性与范围 取羟苯磺酸钙对照品约 20 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 精密量取 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 得系列对照品溶液。精密量取系列对照品溶液各 20 μL, 进样分析, 记录峰面积。以浓度(C , mg·L⁻¹)为横坐标, 峰面积(A)为



A. 对照品; B. 供试品; 1. 羟苯磺酸钙

图2 羟苯磺酸钙高效液相色谱

纵坐标作图, 得羟苯磺酸钙的回归方程为 $Y = 3.052 \times 10^4 X + 1.093 \times 10^4$ ($r = 0.9995$)。结果表明, 羟苯磺酸钙在 20.0 ~ 200.0 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 计算羟苯磺酸钙峰面积的 RSD 0.7%。结果表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 按 2.1.2 项方法平行制备 6 份供试品溶液, 在 2.1.1 条件下进样分析, 记录色谱图, 计算羟苯磺酸钙含量的 RSD 0.9%。结果表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下避光放置, 分别于 0, 1, 3, 6, 10 h 进样分析, 记录色谱图, 计算羟苯磺酸钙峰面积的 RSD 1.1%。结果表明, 供试品溶液在室温下避光放置 10 h 内稳定。

2.1.7 回收率试验 精密称取羟苯磺酸钙对照品约 8, 10, 12 mg 各 3 份, 分别置于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液各 20 μL, 进样分析, 记录色谱图。计算羟苯磺酸钙的平均回收率为 99.4%, RSD 1.0%。结果见表 1。

2.1.8 样品测定 取羟苯磺酸钙对照品和原料药(批号 20111202, 20111203, 20111204), 按 2.1.2 项分别制备对照品溶液和供试品溶液, 进样分析。按外标法以峰面积计算, 3 批原料药的含量分别为 99.6%, 100.3%, 99.2%。

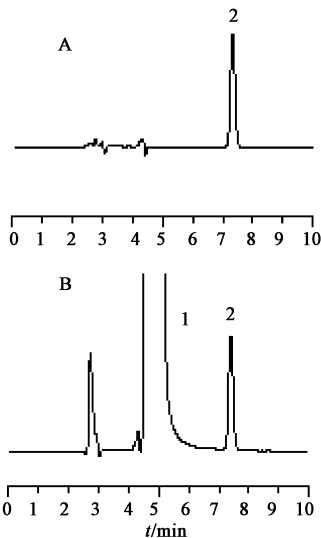
2.2 有关物质检查

2.2.1 色谱条件与系统适用性 色谱条件同含量

表 1 羟苯磺酸钙含量测定回收率

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
7.6	7.52	98.9		
7.7	7.56	98.2		
7.5	7.53	100.3		
9.4	9.49	100.9		
9.6	9.42	98.2	99.4	1.0
9.5	9.54	100.4		
11.1	10.98	98.8		
11.0	11.02	100.0		
11.2	11.07	98.7		

测定项下。取 2.2.2 项的对照品、供试品溶液进样，色谱图见图 3。理论塔板数按氢醌色谱峰计算不低于 5 000，氢醌与羟苯磺酸钙分离度符合要求。



A. 氢醌对照品; B. 限度供试品; 1. 羟苯磺酸钙; 2. 氢醌

图 3 有关物质高效液相色谱图

2.2.2 溶液的制备(避光操作, 2~8℃放置) 供试品溶液及对照溶液:精密称取羟苯磺酸钙原料药约 50 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得羟苯磺酸钙浓度约为 5 g·L⁻¹ 的供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得羟苯磺酸钙浓度约为 5 mg·L⁻¹ 的对照溶液。

对照品溶液:精密称取氢醌对照品约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 量取上述溶液 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 作为氢醌储备液; 精密量取氢醌储备液 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得氢醌浓度

约为 5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

限度供试品溶液:精密称取羟苯磺酸钙原料药约 50 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加入氢醌储备液 5 mL, 加水溶解并稀释至刻度, 得限度供试品溶液。

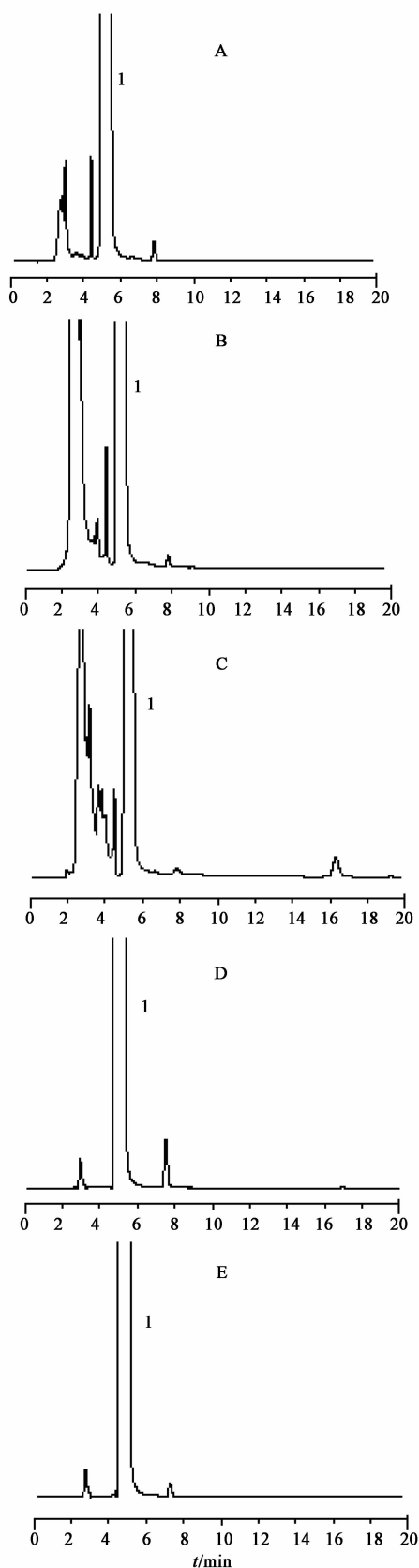
2.2.3 专属性试验 破坏试验:精密称取羟苯磺酸钙原料药约 50 mg, 共 5 份, 分别进行酸、碱、氧化、高温、光照破坏, 破坏条件如下 ①酸破坏:置于 10 mL 量瓶中, 加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 溶解, 于 70℃ 水浴中加热 15 min, 冷却后用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 为中性, 加水稀释至刻度, 摇匀。②碱破坏:置于 10 mL 量瓶中, 加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 溶解, 于 70℃ 水浴中加热 15 min, 冷却后用 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 为中性, 加水稀释至刻度, 摇匀。③氧化破坏:置于 10 mL 量瓶中, 加入 0.3% 过氧化氢溶液 1 mL 溶解, 于 70℃ 水浴中加热 70 min, 冷却后加水稀释至刻度, 摇匀。④高温破坏:置透明表面皿中, 于 105℃ 烘箱中加热 10 d, 精密称定, 转移至 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。⑤光照破坏:置透明表面皿中, 于 (4 500 ± 500) lx 条件下光照 10 d, 精密称定, 转移至 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取各破坏溶液 20 μL, 在上述色谱条件下进样分析, 典型色谱图如图 4 所示。结果表明, 本方法专属性良好, 可应用于本品有关物质的检查。

2.2.4 线性与范围 取氢醌对照品约 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。精密量取上述溶液 2 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 作为对照品储备液。精密量取 0.1, 0.4, 0.8, 2, 4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 即得系列对照品溶液。精密量取上述溶液各 20 μL, 进样分析, 记录峰面积。以质量浓度 (C, mg·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标作图, 得氢醌的回归方程 $Y = 4.876 \times 10^4 X + 0.225 \times 10^3$ ($r = 0.9999$), 结果表明氢醌在 0.1 ~ 10.0 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 检测限与定量限试验 取氢醌对照品溶液用水逐级稀释, 进样分析, 以 3 倍和 10 倍信噪比 (S/N = 3, 10) 计算, 氢醌的检测限和定量限分别为 33.3, 83.2 μg·L⁻¹。

2.2.6 精密度试验 取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 计算氢醌峰面积的 RSD 0.8%。结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按照 2.2.2 项配制 6 份限度供试品溶液, 在 2.2.1 色谱条件进样分析, 记录色谱



A. 酸破坏溶液; B. 碱破坏溶液; C. 氧破坏溶液;
D. 高温破坏溶液; E. 光照破坏溶液; 1. 羟苯磺酸钙

图4 有关物质检查破坏试验色谱

图,计算氢醌含量的 RSD 0.7%,结果表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 2~8℃ 下避光放置,分别于 0,1,2,4,6 h 进样,发现供试品溶液在 2 h 内杂质含量增大,6 h 内杂质数增多。结果表明供试品溶液不稳定,样品测定应临用现配。

取限度供试品溶液,于 2~8℃ 下避光放置,分别于 0,1,2,4,6 h 进样分析,记录色谱图,计算氢醌峰面积的 RSD 0.5%,结果表明,限度供试品溶液在 2~8℃ 下避光放置 6 h 内稳定。

2.2.9 回收率试验 取同一批羟苯磺酸钙原料药(批号 20111202),精密称取 9 份,各约 50 mg,分别置于 10 mL 量瓶中。分别加入氢醌储备液 2.5,5.0,7.5 mL,加水溶解并稀释至刻度,配制成氢醌质量浓度相当于供试品溶液质量浓度的 0.05%,0.1%,0.15%,每个浓度制备 3 份,在 2.2.1 条件下进样分析,记录色谱图。计算氢醌的平均回收率为 98.5%,RSD 0.6%。结果见表 2 所示。

表 2 氢醌回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
50.2	0.010 04	0.024 75	0.034 31	98.1		
49.6	0.009 92	0.024 75	0.034 23	98.2		
50.9	0.010 18	0.024 75	0.034 72	99.1		
50.1	0.010 02	0.049 50	0.058 84	98.6		
49.8	0.009 96	0.049 50	0.058 11	97.3	98.5	0.6
50.5	0.010 10	0.049 50	0.059 26	99.3		
51.3	0.010 26	0.074 25	0.083 76	99.0		
50.2	0.010 04	0.074 25	0.083 05	98.3		
49.1	0.009 82	0.074 25	0.083 24	98.9		

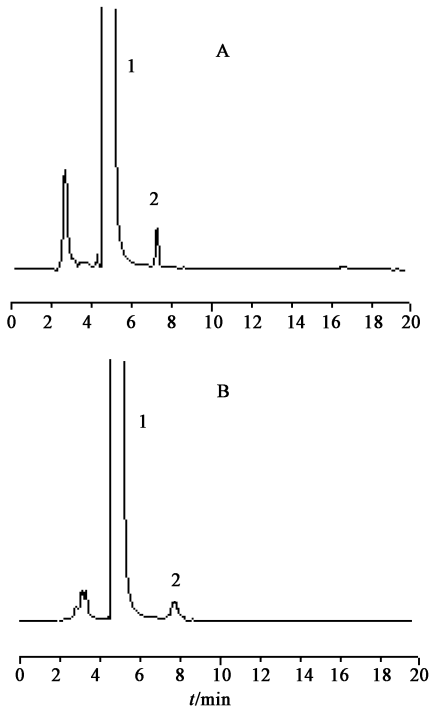
2.2.10 样品测定 取 3 批羟苯磺酸钙原料药(批号 20111202,20111203,20111204)和氢醌对照品,按 2.2.2 项分别制备对照品溶液、供试品溶液和对照溶液。取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,在上述色谱条件下进样分析,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,3 批羟苯磺酸钙原料药中氢醌的含量分别为 0.018%,0.023%,0.021%。另取对照溶液 20 μL,注入液相色谱仪,调节灵敏度,使主成分色谱峰高约为记录仪满量程的 20%,再精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍,用主成分自身对照法计算样品中未知杂质的含量。供试品溶液色谱图中如有杂质,各杂质峰面积之和应小于对照

溶液主峰面积的 2 倍。3 批羟苯磺酸钙原料药中有关物质的总量分别为 0.16%、0.18%、0.13%。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 羟苯磺酸钙极性较强,在 C_{18} 色谱柱上保留时间较短,需通过采用柱长较长的色谱柱及加大水相比比例的方法才能延长保留时间,对色谱柱损害较大。本文采用极性较大的 C_8 色谱柱,可在较小的水相比比例范围内实现主峰与其他杂质峰的有效分离,延长色谱柱使用寿命。

3.2 检测波长的选择 羟苯磺酸钙在 221,301 nm 波长处均有最大吸收。本文分别于 220,300 nm 波长下进样分析,典型色谱图见图 5。结果表明,羟苯磺酸钙与杂质氢醌在 220 nm 波长下均有较好的响应,故选用 220 nm 作为检测波长。



A. 220 nm; B. 300 nm; 1. 羟苯磺酸钙; 2. 氢醌

图 5 羟苯磺酸钙不同波长色谱图

3.3 流动相的选择 尝试了不同比例的磷酸二氢铵-乙腈流动相系统和磷酸二氢钠-乙腈流动相系统,发现 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠-乙腈 (90:10) 为流动相时羟苯磺酸钙保留时间适宜、峰形良好,且可与各杂质达到有效分离。

[参考文献]

- [1] 孙素馨,王宏,孙晓芹. 羟苯磺酸钙的药理作用及临床应用[J]. 中国医药药理学杂志, 2003, 23(2):100.
- [2] 石静丽,阚红卫,王海青,等. 2 型糖尿病大鼠视网膜病变模型的建立及羟苯磺酸钙的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):180.
- [3] 袁文生,吴丰学,代凌云. 羟苯磺酸钙治疗慢性肾功能不全药效研究[J]. 中外医学研究, 2012, 10(14):4.
- [4] 尚军洁. 羟苯磺酸钙胶囊对糖尿病视网膜病变的血液流变学影响[J]. 医学信息, 2010, 23(8):593.
- [5] 曾凡波,崔小瑞,周漠炯,等. 国产羟苯磺酸钙的药效研究[J]. 同济医科大学学报, 2000, 29(5):423.
- [6] 孔德焕,于进堂,高美娟,等. 羟苯磺酸钙对糖尿病大鼠主动脉的保护作用[J]. 山东大学学报:医学版, 2010, 48(10):4.
- [7] 詹利之,杨家庆,林燕芳,等. HPLC 测定青茶伯喹片中萘酚喹的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):103.
- [8] 麻秀萍,蒋朝晖,贾宪生,等. HPLC 测定齐酞酸钠含量及其有关物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):89.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:890.
- [10] 欧洲药典[S]. 2010:1551.
- [11] 陈英,肖玉秀. 羟苯磺酸钙胶囊不同含量测定方法的比较[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(5):480.
- [12] 王静,林志立,吴建伟. RP-HPLC 法测定羟苯磺酸钙分散片中的有关物质[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(6):384.

[责任编辑 顾雪竹]