

藥物食品檢驗局調查研究年報9:27-35,1991
Ann. Rept. NLF D Taiwan R.O.C. 9:27-35,1991



高效液相層析法測定製劑中之Atenolol, Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, Pindolol 及 Propranolol Hydrochloride

王丹紅 徐廷光

第一組

摘要

本文提供一簡單、快速之逆相離子配對高效液相層析法，可同時分離、鑑別並定量五種Aryloxypropanolamine類交感神經 β -感受體遮斷劑：Atenolol, Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, Pindolol, 及Propranolol Hydrochloride之製劑。

本法採用之逆相離子配對高效液相層析系統包括：Lichrospher 100 RP-8層析管(12.5cm \times 4,5 μ m)，移動相為472.4mg 1-hexane-sulfonic acid sodium salt溶於500ml水, 330ml甲醇, 170ml乙腈與0.56ml冰醋酸混合液。流速1.5ml/min, 偵測波長275nm, 層析時間約8分鐘。

本法之檢體前處理簡易，僅須以甲醇(Pindolol以外製劑)或0.1N鹽酸(Pindolol製劑)萃取即可。定量時以Oxprenolol Hydrochloride (Oxprenolol Hydrochloride以外製劑)或Metoprolol Tartrate (Oxprenolol Hydrochloride製劑)為內部標準品。本法之再現性良好，變異係數小於2%。回收率分別是：Atenolol 98.4%，Metoprolol Tartrate 102.3%，Oxprenolol Hydrochloride 100.2%，Pindolol 100.2%，Propranolol Hydrochloride 100.0%。

前言

交感神經 β -感受體遮斷劑為常用之心律不整及高血壓治療劑¹。尤其是Aryloxypropanolamine系列化合物，如Atenolol, Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, Pindolol及Propranolol Hydrochloride等，因其阻斷作用強，類交感神經作用小且無致癌作用，臨床上使用極多²。

有關上述五種成分之製劑分析，於中華藥典、英國藥典或美國藥典收載有Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, 及Propranolol Hydrochloride製劑分析法，使用高效液相層析法或紫外線分光光度法來測定此等成分³⁻⁷。至於Atenolol製劑之分析法，有高效液相層析法及紫外線分光光度法⁸⁻¹⁰等，而Pindolol製劑也有高效液相層析及呈色等分析法^{11,12}。

上述各分析法所使用之層析管，移動相，萃取溶媒，偵測波長等，各不相同。為提高檢驗效率，尋找一精簡且適於分析以上各化合物之檢驗法乃有必要。文獻考查結果，有關上述成分之分析以測定生物檢體中之單一成分居多¹³⁻²⁰，而少數分析製劑之方法²¹⁻²³亦未有以同時分離，鑑別，定量上述五種成分為目的者。有鑑於高效液相層析法之特異性較高，且適於大量檢體之檢驗，因此，我們擬發展一可分析Atenolol, Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, Pindolol, Propranolol Hydrochloride製劑之高效液相層析法。

材料與方法

一、裝置：

(一)液相層析儀:Shimadzu LC-6A Liquid Chromatography溶媒輸送系統;Shimadzu SPD-6AV UV-VIS分光光度偵測器;Shimadzu C-R3A Integrator Chromatopac熱感應積分儀。

操作條件:室溫(25℃),流速1.5ml/min,偵測波長275nm,注射量10 μ l。

(二)液相層析管:Lichrospher 100 RP-8(5 μ m, 125 \times 4mm I.D.,Merck)

溶媒淨化組件:Milli-Q water purification system (Milli-pore Corp.), 0.45 μ m。

二、試藥：

(一)溶媒: 甲醇(皓峰,LC級), 乙腈(J.T.Baker,HPLC級),冰醋酸(和光,試藥特級),鹽酸(和光,試藥特級)

(二)試劑:1-hexanesulfonic acid sodium salt (Sigma), atenolol (AMSA), metoprolol tartrate (Erregierre SPA), oxprenolol hydrochloride (長生堂製藥株式會社), pindolol (Permachem), propranolol hydrochloride (USP ref. std.)。

三、HPLC移動相配置:稱取472.4mg之1-hexanesulfonic acid sodium salt溶於500ml水中,並與330ml甲醇,170ml乙腈,及0.56ml冰醋酸混合。混合液以MilliQ溶媒淨化設備過濾後,置超音波浴中10分鐘除氣。

四、內部標準品溶液:

(一)Oxprenolol hydrochloride內部標準品溶液:

1.稱取適量Oxprenolol Hydrochloride對照標準品,以甲醇溶解並稀釋至300 μ g/ml。(I)

2.稱取適量Oxprenolol Hydrochloride對照標準品,以0.1N鹽酸溶解並稀釋至300 μ g/ml。(II)

(二)metoprolol tartrate內部標準品溶液:

稱取適量metoprolol tartrate 對照標準品,以甲醇溶解並稀釋至500 μ g/ml。

五、標準品溶液:

(一)Atenolol標準品溶液:

稱取適量Atenolol對照標準品,溶於Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(I),並稀釋成濃度為50,100,150,200,250 μ g/ml溶液。

(二)Metoprolol Tartrate標準品溶液:

稱取適量Metoprolol tartrate 對照標準品,溶於Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(I),並稀釋成濃度為200, 400, 500, 600, 800 μ g/ml溶液。

(三)Oxprenolol Hydrochloride標準品溶液:

稱取適量Oxprenolol Hydrochloride對照標準品,溶於Metoprolol Tartrate內部標準品溶液,並稀釋成濃度為100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml溶液。

(四)Pindolol標準品溶液:

稱取適量Pindolol對照標準品,溶於Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(II),並稀釋成濃度為15,25,30,50,60 μ g/ml溶液。

(五)Propranolol Hydrochloride標準品溶液:

稱取適量Propranolol Hydrochloride對照標準品,溶於Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(I),並稀釋成濃度為50, 100, 200,300, 400 μ g/ml溶液。

六、檢量線:

取上述各種成分之各種濃度標準品溶液10 μ l,分別注入高效液相層析儀分析,並重覆五次,求各標的成分與內部標準品面積比之平均值,標準偏差及變異係數。並以濃度對面積比作圖,以統計學方法求出檢量線之線性迴歸方程式及相關係數²⁴。

七、回收率與市售檢品測定:採用標準品添加

高效液相層析法測定製劑

法²⁵：

(一)Atenolol:

1. 稱量Atenolol錠劑(100mg/tab.)至少20顆，求其平均重量後，磨碎。稱取相當於主成分80mg之檢品粉末置100ml容量瓶中，以Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(I) 溶解並稀釋至刻度。過濾，取濾液2ml，以Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液 I 稀釋至20ml²。

另取五支100ml容量瓶，其中除置入相當於80mg Atenolol之檢品粉末外，分別加入10,20,40,80及160mg之Atenolol對照標準品，並以Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(I) 溶解。以下步驟同¹。

(二)Metoprolol Tartrate:

1. 稱量Metoprolol Tartrate錠劑(100mg/tab.)至少20顆，求其平均重量後，磨碎。稱取相當於主成分30mg之檢品粉末置100ml容量瓶中，以Oxprenolol Hydrochloride 內部標準品溶液(I) 溶解並稀釋至刻度，過濾。

2. 另取五支100ml容量瓶，其中除置入相當於30mg Metoprolol Tartrate之檢品粉末外，分別加入3,15,30,40,50mg之Meto-prolol Tartrate對照標準品，並以Oxprenolol Hydrochloride對照標準品溶液(I) 溶解。以下步驟同¹。

(三)Oxprenolol Hydrochloride:

1. 稱量Oxprenolol Hydrochloride錠劑(40mg/tab.)至少20顆，求其平均重量後，磨碎。稱取相當於主成分15mg檢品粉末置作50ml容量瓶中，以Metoprolol Tartrate內部標準品溶液溶解並稀釋至刻度。過濾，取濾液10ml，以Metoprolol tartrate內部標準品溶液稀釋至20ml。

2. 另取五支50ml容量瓶，其中除置入相當於15mg Oxprenolol Hydrochloride之檢品粉末外，分別加入1.5,7.5,15,20,30mg之Oxprenolol Hydrochloride對照標準品，並以Metoprolol tartrate內部標準品溶液溶解。以下步驟同¹。

(四)Pindolol:

1. 稱量Pindolol錠劑(5mg/tab.)至少20顆，求其平均重量後，磨碎。稱取相當於5mg主成

分之檢品粉末置100ml容量瓶中，以Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(II) 溶解並稀釋至刻度，過濾，取濾液4ml，以Oxprenolol Hydrochloride內部標準品溶液(II) 稀釋至20ml。

2. 另取五支100ml容量瓶，其中除置入相當於5mg Pindolol之檢品粉末外，分別加入0.6,5,10,15,20mg之Pindolol對照標準品，並以Oxprenolol Hydrochloride 內部標準品溶液(II) 。以下步驟同¹。

(五)Propranolol Hydrochloride:

1. 稱量Propranolol Hydrochloride錠劑(80mg/tab.)至少20顆，求其平均重量後，磨碎。稱取相當於20mg主成分之檢品粉末置入50ml容量瓶中，以Oxprenolol Hydrochloride 內部標準品溶液(I) 溶解並稀釋至刻度。過濾，取濾液5ml，以Oxprenolol Hydr ochloride內部標準品溶液(I) 稀釋至20ml。

2. 另取五支50ml容量瓶，其中除置入相當於20mg Propranolol Hydrochloride 之檢品粉末外，分別加入2, 10, 20, 30, 40mg 之Propranolol Hydrochloride 對照標準品，並以Oxprenolol Hydrochloride. 內部標準品溶液(I) 溶解。以下步驟同¹。

取上述各成分之各種濃度溶液10 μ l注入高效液相層析儀分析，由所得主成分與內部標準品面積比值，依據前述檢量線方程式求出主成分濃度，計算主成分含量。再以標準品添加量對主成分檢量作圖，求出回收率及檢品之主成分含量。

結果與討論

文獻上有關交感神經 β -感受體遮斷劑之高效液相層析法，多採用逆相層析管，及酸性或含離子配對試劑之移動相。因此，我們首先選用C₈逆相層析管，以甲醇，乙腈及冰醋酸調配之移動相來分離Atenolol, Metoprolol Tartrate, Oxprenolol Hydrochloride, Pindolol及Propranolol Hydrochloride五種成分，但結果並不理想，除滯留時間過長外，Oxprenolol Hydrochloride與Propranolol Hydrochloride之波峰也有嚴重拖尾現象。後來，於移動相中添

Angle

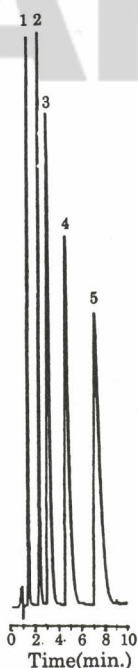


Fig.1. Typical chromatogram of a synthetic mixture of Atenolol(1), Pindolol(2), Metoprolol Tartrate(3), Oxprenolol HCl(4), Propranolol HCl(5).
Column : Lichrospher100 RP-8.
Mobile phase : 472.4 mg of 1-Hexanesulfonic acid sodium salt in a mixture of 330ml of Methanol, 170ml of Acetonitrile and 500 ml of water and adding 0.56ml of Glacial Acetic Acid.
Flow rate : 1.5 ml/min
Detection : 275 nm.

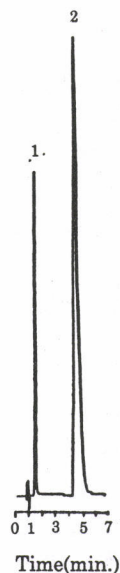


Fig.2. Chromatogram of Atenolol Tablet.
(1) Atenolol, (2) Oxprenolol HCl.
Conditions : The same as in Fig.1.



Fig.3. Chromatogram of Pindolol Tablet.
(1) Pindolol, (2) Oxprenolol HCl.
Conditions : The same as in Fig.1.

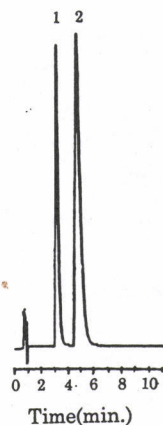


Fig.4. Chromatogram of Metoprolol Tartrate Tablet.
(1) Metoprolol Tartrate, (2) Oxprenolol HCl.
Conditions : The same as in Fig.1.

高效液相層析法測定製劑

加離子配對試劑，上述缺點獲得很大改善。經多次測試結果，採用本法之移動相可將上述五種交感神經 β -感受體遮斷劑完全分離，層析時間僅需8分鐘，其溶出順序依次為：Atenolol (1.4分鐘)，Pindolol (2.4分鐘)，Metoprolol Tartrate (3.3分鐘)，Oxprenolol Hydrochloride

(4.9分鐘)，Propranolol Hydrochloride (7.5分鐘)。其層析圖譜詳見圖1。

為進行含量測定所製作之各成分檢量線如圖7-11。各成分之線性範圍分別是：Atenolol 50-250 μ l/ml，Metoprolol Tartrate 200-800 μ g/ml，Oxprenolol Hydrochloride



Fig.5. Chromatogram of Oxprenolol HC1 Tablet.
(1) Metoprolol Tartrate, (2) Oxprenolol HC1.
Conditions : The same as in Fig.1.

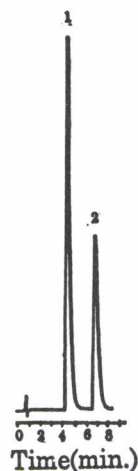


Fig.6. Chromatogram of Propranolol HC1 Tablet.
(1) Oxprenolol HC1, (2) Propranolol HC1.
Conditions : The same as in Fig.1.

Table 1. Reproducibility of HPLC determination of five β -blockers carried out with pure substances (the results given are the mean of 5 injections)

	Atenolol	Pindolol	Metoprolol Tartrate	Oxprenolol Hydrochloride	Propranolol Tartrate
concentration (μ g / ml)	200	30	200	100	400
area ratio	0.478	0.344	0.374	0.335	2.814
standard deviation	0.0070	0.0021	0.0041	0.0054	0.0226
coefficient of variation (%)	1.46	0.61	1.10	1.61	0.80

100-500 $\mu\text{g/ml}$, Pindolol 15-60 $\mu\text{g/ml}$, Propranolol Hydrochloride 50-400 $\mu\text{g/ml}$ 。而迴歸直線方程式則為:

(1)Atenolol: $Y = 0.0070 + 0.0024x$, 相關係數 $r = 0.9998$

(2)Metoprolol Tartrate: $Y = -0.0239 + 0.0020 X$, 相關係數 $r = 0.9998$

(3)Oxprenolol Hydrochloride: $Y = -0.0667 + 0.0038 X$, 相關係數 $r = 0.9972$

(4)Pindolol: $Y = -0.0112 + 0.0119X$, 相關係數 $r = 0.9994$

(5)Propranolol Hydrochloride: $Y = -0.0713 + 0.0072 X$, 相關係數 $r = 0.9987$ 其中 $X = \text{濃}$

度, $Y = \text{標的成分與內部標準品面積比}$ 。

為測試層析過程之再現性, 反覆注射各成分之標準品溶液五次, 計算標的成分與內部標準品面積比之變異係數, 結果其值均小於2%, 顯示本法之精密度良好。詳見表一。

以標準品添加法進行回收率試驗, 所得回收率均接近100%, 顯示本法準確度高, 詳見表2。而以本法測定市售檢品, 未發現賦形劑干擾現象, 測得結果以對標誌量百分比表示, 見表二。市售檢品之層析圖譜見圖二~六。

由上述實驗結果可知: 本法之層析時間短, 具特异性, 精密性與準確性, 適合 Atenolol, Metoprolol tartrate, Oxprenolol Hydro-

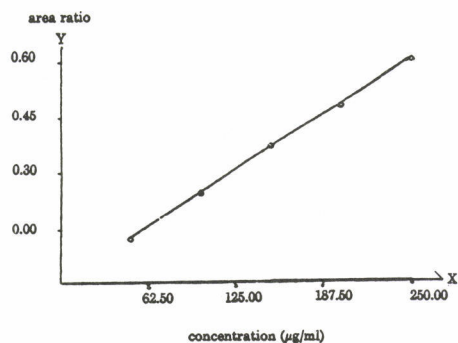


Fig.7. HPLC calibration line of Atenolol.

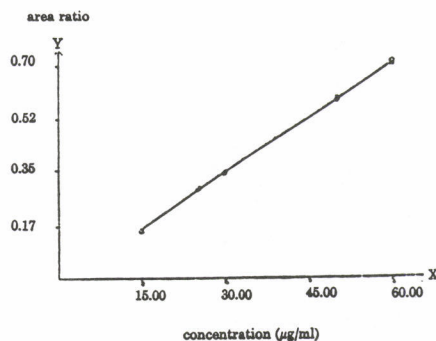


Fig.8. HPLC calibration line of Pindolol.

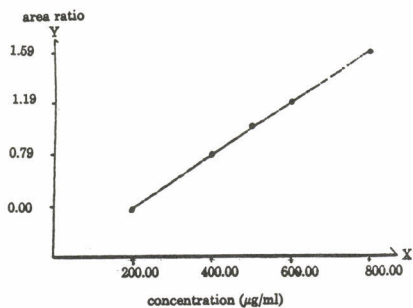


Fig.9. HPLC calibration line of Metoprolol Tartrate.

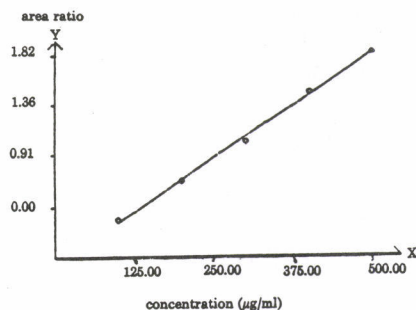


Fig.10. HPLC calibration line of Oxprenolol.HCl.

高效液相層析法測定製劑

Table 2. Recovery data and assay values for samples of β -blockers

Sample	Added, mg	Rec, %	Assay value, %
Atenolol	10	98.4	97.2
	20		
	40		
	80		
	160		
Metoprolol Tartrate	3	102.3	94.5
	15		
	30		
	40		
	50		
Oxprenolol Hydrochloride	1.5	100.2	92.3
	7.5		
	15		
	20		
	30		
Pindolol	0.6	100.2	92.4
	5		
	10		
	15		
	20		
Propranolol Hydrochloride	2	100.0	92.6
	10		
	20		
	30		
	40		

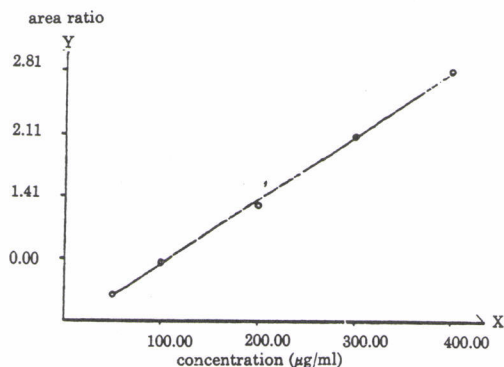


Fig.11. HPLC calibration line of Propranolol HCl.

chloride, Pindolol及Propranolol Hydrochloride製劑之例行檢驗使用。

參考文獻

1. Alfonso R Gennaro. 1985. Remingtons Pharmaceutical Sciences, 17th ed. p.903-907. Mack Publishing Company. Pennsylvania.

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

2. 許光淦, 徐人英, 1975. 藥物化學. 第一版. p.295. 合記圖書出版社. 台北.
3. United States Pharmacopeial Convention. 1985. USP XXI and NF XVI. p.690, United States Pharmacopeial Convention. Inc. Md.
4. British Pharmacopeia commission. 1980. British Pharmacopoeia. p.797. Her Majesty Stationery Office. London.
5. British Pharmacopeia commission. 1980. British Pharmacopoeia. p.815. Her Majesty Stationery Office. London.
6. 中華藥典編修委員會. 1980. 中華藥典. 第三版. p.377-378. 行政院衛生署. 台北.
7. United States Pharmacopeial Convention. 1985. USP XXI and NF XVI. p.908. United States Pharmacopeial Convention. Inc. Md.
8. 本局現行使用方法第(70)20393號.
9. Ficarra. R. et al. 1985. Farmaco. Ed. Prat. 40(9) : 307-312. (Abstr.)
10. 本局現行使用方法第(70)08005號.
11. 本局現行使用方法第(77)035295號.
12. Mahrous. M. S. et al. 1986. Anal. Lett. 19 (7-8) : 901-914. (Abstr.)
13. Bhamra. R. K. et al. 1983. Ther. Drug. Monit. 5 (3) : 313-318.
14. Gengo. F. M. et al. 1984. J. Pharm. Sci. 73 (7) : 961-963.
15. Wong. S. H. Y. et al. 1985. Ther. Drug Monit. 7 (3) : 358-363.
16. Spahn. H. et al. 1985. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 43 (2) : 458-464.
17. Smith. H. T. 1987. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 59 (1) : 95-103.
18. Pflugmann. G. et al. 1987. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 60 (2) : 331-339.
19. Cartoni, G. P. et al. 1988. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 11 (7) : 528-532. (Abstr.)
20. Miller. L. G. et al. 1986. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 54 (1) : 201-204.
21. Ficarra. P. et al. 1986. Farmaco. Ed. Prat. 41 (10) : 332-337. (Abstr.)
22. Olsen. C. S. 1987. Pharmacopeial Forum. 13 (1) : 2177-2179.
23. Singbal. D. M. et al. 1986. Indian Drugs. 24 (5) : 270-271. (Abstr.)
24. 楊志良. 1983. 生物統計學新論. P.42及 Chapt.12. 巨流圖書公司. 台北.
25. Miller. J. C. Miller. J. N. 1986. Statistics for Analytical Chemistry. p.100-102. Ellis Horwood Limited. England.

高效液相層析法測定製劑

Angle

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ATENOLOL, METOPROLOL TARTRATE, OXPRENOLOL HYDROCHLORIDE, PINDOLOL AND PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS

DAN-HONG WANG AND TING-GUANG SHYU

DIVISION OF DRUG CHEMISTRY

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatography is presented for determining atenolol (I), metoprolol tartrate (II), oxprenolol hydrochloride (III), pindolol (IV), propranolol hydrochloride (V) in commercial formulations.

The method consists of an extraction of samples with methanol or 0.1N hydrochloric acid, separated on an octy-

lsilane column with a mixture of water, methanol, acetonitrile, and acetic acid (500 : 300 : 170 : 0.56) containing 472.4mg sodium 1 hexanesulfonate as a mobile phase and detected at 275 nm. The duration of each analysis is less than 10 min. Average recoveries are 98.4%, 102.3%, 100.2%, 100.2%, and 100.0% for compounds I - V, respectively.