

HPLC 法测定盐酸氨溴索注射液中有有关物质

王 博¹, 李洪起¹, 徐 芳¹, 连潇嫣¹, 任晓文^{1,2}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 采用 HPLC 法测定盐酸氨溴索注射液中的有关物质。方法 采用 Agela Venusil MP C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以磷酸氢二铵缓冲液 (pH 4.0) - 甲醇 (40:60) 为流动相, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温: 30 °C。结果 盐酸氨溴索和反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹啉-3(2H)]环己醇的最小检出限分别为 15、30 ng; 杂质的线性范围为 0.72~1.68 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 加样平均回收率为 101.32%, RSD 为 0.92% ($n=9$)。结论 该方法测定盐酸氨溴索注射液中的有关物质方法简便、准确、专属性强。

关键词: 盐酸氨溴索注射液; 有关物质; 盐酸氨溴索; 反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹啉-3(2H)]环己醇; 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(2012)03 - 0226 - 03

Determination of related substances in Ambroxol Hydrochloride Injection by HPLC

WANG Bo¹, LI Hong-qi¹, XU Fang¹, LIAN Xiao-yan¹, REN Xiao-wen^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop a method for the determination of related substances in Ambroxol Hydrochloride Injection. **Methods** The analysis was performed on an Agela Venusil MP C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was ammonium dibasic phosphate buffer (pH 4.0)-methanol (40:60) with flow rate at 1.0 mL/min. The detection wavelength was 250 nm and column temperature was 30 °C. **Results** The minimum detection limit of ambroxol hydrochloride and trans-4-[(2-amino-3,5-dibromo-phenyl) methyl] amino]-cyclohexanol was 15 ng and 30 ng, respectively. The calibration curve of impurity was linear in the range of 0.72—1.68 μg/mL ($r=0.999\ 6$); An average recovery rate of 101.32% was obtained with RSD 0.92% ($n=9$). **Conclusion** This method is simple, accurate and with good specificity and could be used to determine the related substances in Ambroxol Hydrochloride Injection.

Key words: Ambroxol Hydrochloride Injection; ambroxol hydrochloride; related substances; trans-4-[(2-amino-3,5-dibromo-phenyl) methyl] amino]-cyclohexanol; HPLC

盐酸氨溴索注射液 (Ambroxol Hydrochloride Injection) 是目前临床上应用较广的黏液溶解型祛痰药, 主要应用于各种急慢性呼吸道疾病引起的痰液黏稠、咳痰困难, 术后肺部并发症的预防性治疗, 早产儿及新生儿呼吸窘迫综合征的治疗。《中国药典》2010 年版收载有盐酸氨溴索及其口服制剂 (片剂、胶囊和缓释胶囊)。另外《中国药典》针对盐酸氨溴索的有关物质测定方法中, 反式-4-[6,8-二溴-

1,4-二氢喹啉-3(2H)]环己醇仅作为系统适用性试验中分离的要求, 但是该物质作为盐酸氨溴索中主要的已知杂质, 其定量研究显得尤为重要。本实验就盐酸氨溴索注射液中的反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹啉-3(2H)]环己醇进行了研究, 建立了高效液相色谱法测定盐酸氨溴索注射液中该物质的方法, 为盐酸氨溴索注射液的质量控制提供了一种有效测定方法。

收稿日期: 2012-02-22

基金项目: “十二五”重大新药创制科技重大专项项目 (2011ZX09201-101-19); 国家重点基础研究发展计划项目 (2010CB735602)

作者简介: 王 博 (1983—), 男, 河南南阳人, 助理研究员, 硕士, 从事药物制剂新剂型与新技术研究。

Tel: (022)23006953 E-mail: wangbo0990@163.com

1 仪器与试剂

美国 SSI 液相色谱仪, Lab Alliance Model 500 检测器, Lab Alliance Series III 泵, Lab Alliance spectra system AS 3000 进样器。

盐酸氨溴索对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100599-200502), 反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹啉-3(2*H*)]环己醇对照品(德国 LGC 标准品公司, 批号 1586), 国产盐酸氨溴索注射液(天津药物研究院药业有限公司, 商品名伊诺舒, 规格 15 mg/支, 2 mL/支, 批号 100648、100649、100650; 规格 30 mg/支, 4 mL/支, 批号 100319、100320、100321), 进口盐酸氨溴索注射液(德国勃林格殷格翰国际公司, 商品名沐舒坦, 规格 15 mg/支, 2 mL/支, 批号 827900A、927720、927798), 甲醇、乙腈(色谱纯), 磷酸氢二铵、磷酸(分析纯), 去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1-2]

Agela Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸氢二铵缓冲液(pH 4.0) - 甲醇(40:60); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 系统适应性试验

取 150 μg/mL 盐酸氨溴索对照品溶液, 进样 20 μL, 记录色谱图。在上述色谱条件下, 主峰与各有关物质峰之间均达到基线分离($R \geq 1.5$), 理论塔板数以盐酸氨溴索计在 3 000 以上。

2.3 有关物质测定方法

精密量取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。另取杂质对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇溶解, 并用流动相稀释, 制成 1.2 μg/mL 溶液, 摇匀, 作为杂质对照品溶液。照以上色谱条件, 精密量取供试品溶液与杂质对照品溶液各 20 μL, 分别进样, 记录色谱图至主成分保留时间的 4 倍, 供试品溶液中如有与杂质对照品溶液色谱图中相对应的峰, 按外标法以峰面积计算杂质的含量。另精密称取盐酸氨溴索对照品适量, 同法测定。结果见图 1。

2.4 辅料干扰试验

取盐酸氨溴索注射液处方辅料, 用流动相制成相当于含盐酸氨溴索 150 μg/mL 的空白辅料溶液, 进样 20 μL, 按上述色谱条件测定, 由图 1 可知, 辅料不干扰主药的测定。

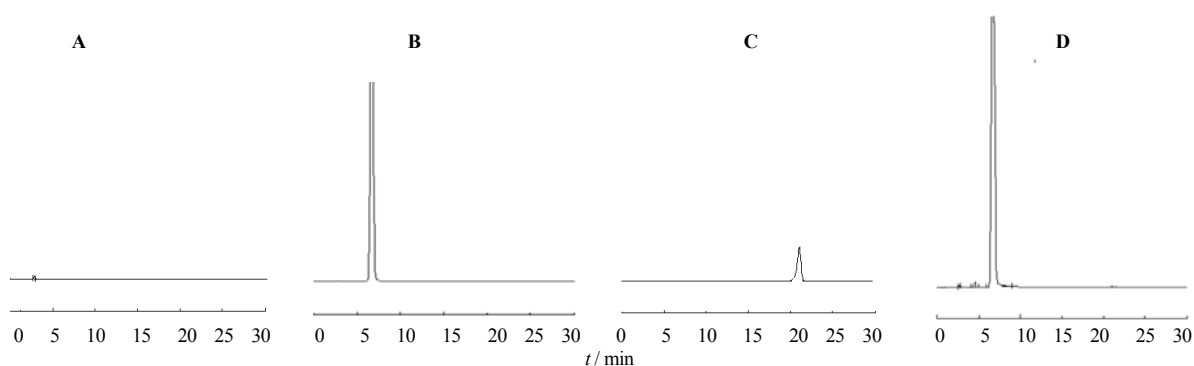


图 1 空白辅料(A)、盐酸氨溴索(B)、杂质(C)和盐酸氨溴索注射液(D) HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of blank adjuvant (A), ambroxol hydrochloride (B), impurity (C), and Ambroxol Hydrochloride Injection (D)

2.5 专属性试验

为验证本方法对相关降解产物的专属性, 对盐酸氨溴索注射液分别进行强酸、强碱、高温和强光降解试验。取盐酸氨溴索注射液 4 份, 分别用盐酸调 pH 1, 氢氧化钠调 pH 12, 置于沸水浴 3~5 h, 置强光(4 500±500) lx 条件下照射 10 d, 各进样 20 μL, 记录色谱图。相关降解产物的杂质峰均能与盐酸氨溴索完全分离, 分离度符合要求; 杂质与盐

酸氨溴索峰的纯度均符合要求。

2.6 标准曲线的制备

精密称取反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹啉-3(2*H*)]环己醇对照品适量, 加甲醇溶解稀释成 0.72、0.96、1.2、1.44、1.68 μg/mL 对照品溶液, 各进样 20 μL, 记录色谱图。以峰面积积分值对质量浓度进行线性回归, 得标准曲线方程 $A=14\ 852\ C+332.8$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明杂质质量浓度在 0.72~1.68

$\mu\text{g/mL}$ 时, 质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.7 检测限的测定

取盐酸氨溴索对照品溶液与杂质对照品溶液, 分别稀释若干倍, 分别进样 $20\ \mu\text{L}$, 记录主峰峰高约为基线噪音 3 倍时的色谱图, 测得盐酸氨溴索的最低检测限为 $15\ \text{ng}$, 杂质的检测限为 $30\ \text{ng}$ 。

2.8 稳定性试验

取杂质对照品溶液适量, 于室温放置, 分别于 0、0.5、1、1.5、2、4 h 进样, 分别进样 $20\ \mu\text{L}$, 记录色谱图, 计算得杂质峰面积的 RSD 为 0.76%。结果表明杂质溶液在室温 4 h 内稳定性良好。

2.9 精密度试验

取杂质反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹唑啉-3(2H)]环己醇对照品溶液适量, 按上述色谱条件, 分别进样 $20\ \mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 得峰面积的 RSD 为 0.32%。

2.10 加样回收率试验

精密称取盐酸氨溴索适量, 配制 $150\ \mu\text{g/mL}$ 溶液 9 份, 分别精密加入相当于标示量 80%、100%、120% 的反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹唑啉-3(2H)]环己醇对照品溶液各 3 份, 用流动相定容, 摇匀。在上述色谱条件下, 分别进样 $20\ \mu\text{L}$, 记录色谱图。计算得平均回收率为 101.32%, RSD 为 0.92%。

2.11 样品测定

按上述有关物质检查方法的色谱条件, 对各批次样品分别进行测定, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择^[3]

实验共采用考察了 Diamond C_{18} 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)、Thermo Hypersil C_{18} 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) 和 Agela Venusil MP C_{18} 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) 3 种色谱柱。所得图谱显示盐酸氨溴索主峰与杂质以及其他杂质峰的分度均符合要求, 方法适应性较强。

3.2 流动相的选择^[4]

通过考察磷酸盐缓冲液-乙腈系统以及磷酸盐缓冲液-甲醇系统, 发现在这两个系统中, 盐酸氨溴索与其他杂质峰均能完全分离, 但是采用磷酸盐缓冲液-乙腈系统时, 杂质反式-4-[6,8-二溴-1,4-二

表 1 盐酸氨溴索注射液有关物质测定结果

Table 1 Determination of related substances in Ambroxol

Hydrochloride Injection					
商品名	规格	批号	有关物质/%	总量/%	
沐舒坦	15 mg/ 支	827900A	0.081	0.69	
		927720	0.076	0.64	
		927798	0.070	0.61	
伊诺舒	15 mg/ 支	100648	0.074	0.35	
		100649	0.080	0.45	
		100650	0.071	0.42	
	30 mg/ 支	100319	0.072	0.36	
		100320	0.071	0.35	
		100321	0.079	0.38	

氢喹唑啉-3(2H)]环己醇峰在盐酸氨溴索主峰前, 与溶剂峰、辅料峰距离较近, 影响测定, 改变流动相组成、调节缓冲液 pH 值未发现有明显改观, 所以最终确定采用磷酸盐缓冲液-甲醇系统。经过反复筛选和考察, 选定流动相组成为磷酸氢二铵-甲醇 (40:60), 在该条件下, 色谱峰拖尾因子约为 1.02, 杂质峰与其他杂质峰能完全分离。

3.3 杂质的稳定性

杂质反式-4-[6,8-二溴-1,4-二氢喹唑啉-3(2H)]环己醇对照品溶液在常温条件下, 稳定性差, 长时间放置含量有所降低, 另外目前国内该杂质对照品难以获得, 均从国外厂家购得, 成本较高, 所以在实验中, 对照品溶液需临用新配, 或者将对照品溶液置 $0\sim 4\ ^\circ\text{C}$ 冷藏放置, 试验发现杂质对照品溶液冷藏放置后, 在 12 h 内基本稳定, RSD 为 1.21% ($n=12$)。

参考文献

- [1] 沈金芳, 崔 岚. 3 种盐酸氨溴索注射液的稳定性比较 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(22): 1955-1957.
- [2] 纪传侠, 孟 科, 李 雯, 等. HPLC 法测定注射用盐酸氨溴索中的含量及有关物质 [J]. 化工时刊, 2008, 22(4): 40-42.
- [3] 夏 瑞, 代 红, 车宝泉. RP-HPLC 测定盐酸氨溴索葡萄糖注射液中有关系物质 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(6): 496-498.
- [4] 李 伟, 夏定兵, 陈 亦. 盐酸氨溴索注射液的测定方法研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2011, 13(2): 47-48.