

• 实验研究 •

HPLC-DAD-MS 法测定异丙托溴铵原料药中有关物质

周颖, 魏宁漪, 高蕾, 何兰, 宁保明*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 建立测定异丙托溴铵原料药中有关物质的高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱(HPLC-DAD-MS)法。方法 采用 HPLC-MS 法, Alltima C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 乙酸铵-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量: 0.25 mL/min; 柱温: 35 °C, 进样量: 10 μL; 检测波长: 220 nm。采用离子阱(ESI)正负离子模式进行检测, 源温 110 °C; 脱溶剂温度 350 °C; 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 锥孔气体积流量 50 L/h。结果 异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 在 0.01~10.00、0.012~12.000、0.083~8.300、0.05~5.00 mg/mL 显示良好的线性关系; 异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 的最低检测限分别为 1.46、0.57、4.16、5.03 ng; 异丙托溴铵、杂质 C、托品酸乙酯和杂质 F 的定量限分别为 4.38、1.71、12.48、15.09 ng。结论 该方法灵敏度高、选择性高、检测限低, 为异丙托溴铵的质量控制提供依据。

关键词: 异丙托溴铵; 托品酸; 托品酸乙酯; 高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱法

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)10-1815-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.10.001

Determination of related substances in ipratropium bromide active pharmaceutical ingredients by HPLC-DAD-MS

ZHOU Ying, WEI Ning-yi, GAO Lei, HE Lan, NING Bao-ming

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish determination of the related substances in ipratropium bromide active pharmaceutical ingredients by HPLC-DAD-MS. **Methods** HPLC-MS method was adopted. The determination was carried out on Alltima C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), which mobile phase consisted of 0.01 mol/L ammonium acetate - acetonitrile with gradient elution. The column temperature was set at 35 °C at a flow rate of 0.25 mL/min. Injection volume was 10 μL. The detective wavelength was set at 220 nm. The ion trap (ESI) positive and negative ion mode was used as detection mode. Source temperature was set at 110 °C with desolvent temperature of 350 °C. The flow rate of desolvent and cone gas were 600 and 50 L/h. **Results** There were good linear relationships of ipratropium bromide, tropic acid, tropic acid ethyl ester, and impurity F in the concentration ranges of 0.01 — 10.00, 0.012 — 12.000, 0.083 — 8.300, and 0.05 — 5.00 mg/mL, respectively. The limit of detection was 1.46, 0.57, 4.16, and 5.03 ng with limit of quantitation 4.38, 1.71, 12.48, and 15.09 ng, respectively. **Conclusion** The method has high sensitivity, high selectivity, and low detection limit which can be used in quantity control for ipratropium bromide active pharmaceutical ingredients.

Key words: ipratropium bromide; tropic acid; tropic acid ethyl ester; HPLC-DAD-MS

异丙托溴铵化学名为[(1*R*,5*S*)-8-甲基-8-异丙基-8-氮杂双环[3.2.1]辛-3-基]3-羟基-2-苯基丙酸酯溴化物, 是一种具有抗胆碱能特性的四价铵化合物, 主要用于慢性阻塞性肺疾病引起的支气管痉挛的维持

治疗, 包括慢性支气管炎和肺气肿。异丙托溴铵气雾剂的支气管扩张作用基本上是局部的、特异性的, 无全身性作用^[1-3]。《中国药典》2015年版尚未收录该品种。《英国药典》2015年版^[4]收录了异丙托

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 国家重大新药创制专项(2015ZX093001002009)

作者简介: 周颖, 女, 主管药师, 主要从事化学药品质量控制研究。Tel: (010)53851459 E-mail: zhouying@nifdc.org.cn

*通信作者 宁保明, 工作于中国食品药品检定研究院。

溴铵, 采用甲醇与磷酸盐缓冲溶液进行洗脱, 检测波长为 220 nm, 分析其可能存在的微量杂质包括杂质 A、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F, 其化学结构

见图 1。因此, 本研究建立高效液相色谱-二极管阵列检测器-质谱 (HPLC-DAD-MS) 法测定异丙托溴铵原料药中的有关物质, 为其质量控制提供参考。

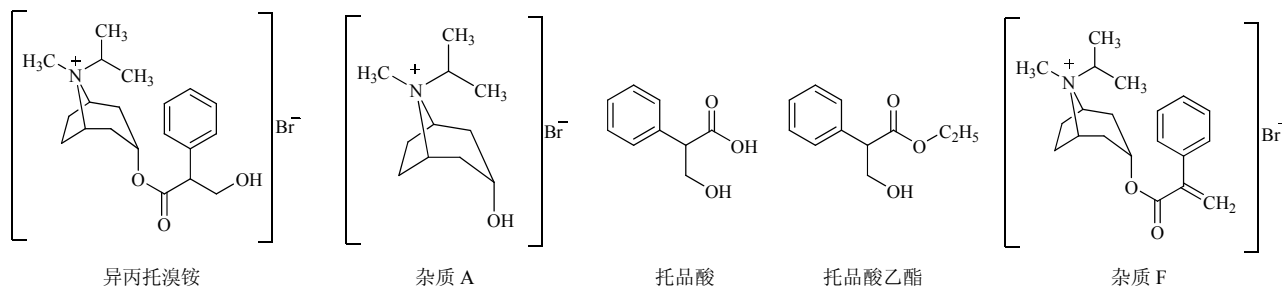


图 1 异丙托溴铵及有关物质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of ipratropium bromide and its related substances

1 仪器与试剂

Waters UPLC 液相色谱-Quattro Premier 串联四级杆质谱仪、Waters HPLC 液相色谱仪由美国 Waters 科技公司提供; AE240 电子天平由梅特勒托利多仪器 (上海) 有限公司提供。

异丙托溴铵对照品由中国食品药品检定研究院提供, 产品批号 100522-200601, 质量分数 99.6%; 异丙托溴铵原料药, 实验室自制, 产品批号 HZ201510601, 质量分数 99.9%; 产品批号 HZ201510602, 质量分数 99.9%; 产品批号 HZ201510701, 质量分数 99.9%; 杂质 A 对照品, 实验室自制, 质量分数 95.0%; 托品酸乙酯, 实验室自制, 质量分数 98.2%; 托品酸对照品由中国食品药品检定研究院提供, 产品批号 101385-201501, 质量分数 100%; 杂质 F 对照品, 实验室自制, 质量分数 97.0%; 乙腈由百灵威科技有限公司提供, 色谱纯; 甲酸、乙酸铵均由北京化工厂提供, 分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Alltima C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 乙酸铵 (甲酸调 pH 值至 3.5, A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~7 min, 87% A; 7~9 min, 87%→70% A; 9~15 min, 70% A; 15~20 min, 87% A; 体积流量: 0.25 mL/min; 柱温: 35 °C, 进样量: 10 μL; 检测波长: 220 nm。

2.2 质谱条件

源参数 ESI⁺: 毛细管电压 1.50 kV; 锥孔电压 20 V; 源参数 ESI⁻: 毛细管电压 2.50 kV; 锥孔电压 15 V; 源温 110 °C; 脱溶剂温度 350 °C; 脱溶剂气体流量 600 L/h; 锥孔气体流量 50 L/h。

2.3 溶液的配制

2.3.1 混合对照品溶液的制备 分别称取杂质 A、托品酸乙酯、托品酸、杂质 F 和异丙托溴铵对照品 1.0、1.2、1.0、1.1、1.2 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 加水-乙腈 (87:13) 溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL 上述溶液置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取异丙托溴铵 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀即得供试品储备液。精密量取 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察

精密称取异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 对照品适量, 分别用溶剂稀释成约 0.001、0.012 5、0.125、0.25、0.5、1.0 mg/mL 的系列对照品混合溶液。按上述色谱条件, 进样量 10 μL, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 的回归方程分别为 $Y=18\ 636 X+61.346$ ($r=0.999\ 9$)、 $Y=16\ 857 X-218.52$ ($r=0.999\ 7$)、 $Y=3\ 712 X-730.08$ ($r=0.999\ 9$)、 $Y=3937.6 X-252.11$ ($r=0.999\ 7$)。结果异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 在 0.01~10.00、0.012~12.000、0.083~8.300、0.05~5.00 mg/mL 显示良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取供试品溶液, 精密量取 20 μL, 按照上述色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积, 结果 RSD 值为 0.2%。

2.6 检测限和定量限

分别称取异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 对照品适量，加溶剂稀释成质量浓度分别为 0.438、0.171、1.284、1.509 $\mu\text{g/mL}$ 的定量限溶液。取各定量限溶液 3 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，作为检测限溶液。异丙托溴铵、托品酸、托品酸乙酯和杂质 F 的最低检测限分别为 1.46、0.57、4.16、5.03 ng；异丙托溴铵、杂质 C、托品酸乙酯和杂质 F 的定量限分别为 4.38、1.71、12.48、15.09 ng。

2.7 稳定性试验

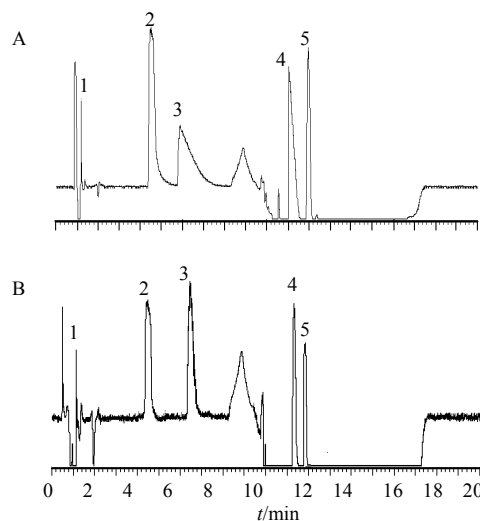
取供试品溶液，分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样测定，进样量 20 μL 。测定异丙托溴铵的峰面积，RSD 值为 0.3%，表明异丙托溴铵溶液在 24 h 内稳定。

2.8 系统适用性试验

取混合对照品溶液和供试品溶液，分别注入 HPLC-MS 仪，HPLC-DAD-MS 离子源采用 ES，扫描模式为正负离子，异丙托溴铵、杂质 A、托品酸、托品酸乙酯、杂质 F 的 $[M+H]^+$ m/z : 332.2、184.1、165.0、195.2、314.3。HPLC-MS 图谱见图 2。结果异丙托溴铵和各杂质的分离度均大于 1.5。

2.9 原料药中杂质测定

取异丙托溴铵原料药 3 批，制备供试品溶液。进行测定，进样量 10 μL 。样品重复测定 3 次，采用外标法，以杂质 F 对照品为对照，计算杂质的量，结果显示 3 批原料均检出杂质 F，分别为 HZ201510601: 0.07%; HZ201510602: 0.06%; HZ201510701: 0.07%，异丙托溴铵原料药的质量分数分别为 99.93%、99.94%、99.93%。



1-杂质 A 2-托品酸 3-异丙托溴铵 4-托品酸乙酯 5-杂质 F

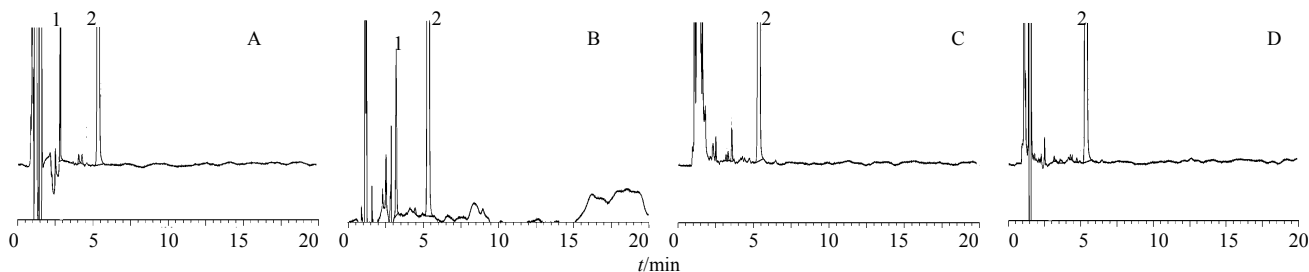
1-impurity A 2-tropic acid 3-ipratropium bromide 4-tropic acid ethyl ester 5-impurity F

图 2 异丙托溴铵 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC-MS 图谱
Fig. 2 HPLC-MS spectra of ipratropium bromide (A) and mixed reference substances (B)

2.10 降解试验

取供试品溶液适量置于具塞试管中，加 1 mol/L 硫酸溶液 1.5 mL，于 90 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 h；取上述降解后的样品，调节 pH 值至中性，作为酸降解试验溶液。取供试品溶液适量置于具塞试管中，加 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 1.5 mL，放置 15 min；取上述降解后的样品，调节 pH 值至中性，作为碱降解试验溶液。

取供试品溶液适量置于具塞试管中，加 5% 过氧化氢溶液 2.8 mL，于 90 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 h，作为氧化降解试验溶液。取供试品溶液适量置于具塞试管中，于 90 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h，作为高温降解试验溶液。进行测定，进样量 10 μL ，结果见图 3。供试品溶液经强酸和强



1-杂质 C 2-异丙托溴铵

1-impurity C 2-ipratropium bromide

图 3 酸降解样品 (A)、碱降解样品 (B)、氧化降解样品 (C)、高温降解样品 (D) HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of acid degradation sample (A), alkaline degradation sample (B), oxidative degradation sample (C), and high-temperature degradation sample (D)

碱破坏,均产生杂质 A 和托品酸两个杂质峰;供试品溶液经氧化和高温破坏,杂质均未见明显增加,提示异丙托溴铵在高温及氧化条件下较稳定。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

《英国药典》2015 年版收载了异丙托溴铵,采用甲醇与磷酸盐缓冲溶液进行洗脱,检测波长为 220 nm,以甲醇为流动相,在 220 nm 处进行检测,基线的波动较大,将流动相中甲醇改为乙腈,对基线波动有一定的改善。比较了不同组成的流动相,结果以乙酸铵-乙腈梯度洗脱效果较好,流动相酸度会影响异丙托溴铵及其杂质的色谱行为。在比较了不同比例的流动相后,选定 0.01 mol/L 乙酸铵(甲酸调 pH 值至 3.5)-乙腈为流动相,梯度洗脱,使得拖尾现象得到改善,峰对称性好,各峰分离度均大于 1.5。比较了不同柱温对分离度的影响,结果显示柱温在 35 °C 时色谱峰对称性较好。

3.2 降解途径

《英国药典》、《欧洲药典》和《美国药典》35 版中均未包含托品酸的检测。《英国药典》采用薄层色谱的方法对杂质 A 单独检查。

降解实验中强酸和强碱条件下均在 1 min 左右出现杂质 A 峰,该杂质峰在紫外下无吸收,极性高,在色谱柱保留时间很短,由于杂质 A 和托品酸均为可能出现的降解杂质,而杂质 A 在紫外检测器中不出峰,因此利用质谱方法可对杂质 A 进行检测。异丙托溴铵在水中的降解反应途径见图 4,异丙托溴铵失去一分子水产生杂质 F,异丙托溴铵与一分子水结合,生成等摩尔的杂质 A 与托品酸。

研究表明样品在室温放置较长时间会导致杂质 A 和托品酸增加^[5],在药品质量标准中,要求所采

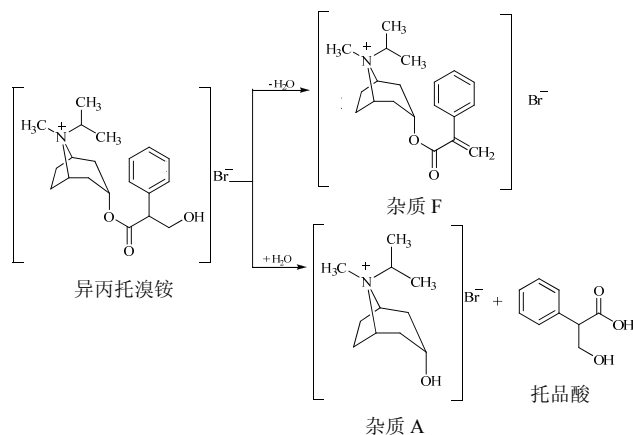


图 4 异丙托溴铵的降解反应途径

Fig. 4 Degradation reaction way of ipratropium bromide

质,而且能分离出各类潜在的杂质,并对分离出的主要杂质能进行定性,以便根据其来源和生理活性制定不同的质控限度^[6]。本实验为异丙托溴铵的质量控制以及化学对照品的标化提供了参考。

参考文献

- [1] 舒宏,崔一民,侯曙光. 肺部吸入给药制剂及临床应用 [J]. 临床药物治疗杂志, 2014, 12(2): 18-24.
- [2] 王义芬,刘忠利,任冬梅. 异丙托溴铵雾化液联合 3% 高渗盐水辅助治疗小儿毛细支气管炎的临床观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(8): 876-879.
- [3] 刘莉敏,谢艳丽,王以炳,等. 异丙托溴铵联合舒利迭治疗重度哮喘的疗效 [J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(1): 80.
- [4] British Pharmacopoeia [S]. BP2015
- [5] 陈红,朱蓉. HPLC 法测定异丙托溴铵原料药中的有关物质 [J]. 中国药房, 2014, 25(12): 1128-1131.
- [6] 胡昌勤. 化学药品杂质控制的现状与展望 [J]. 中国科学化学, 2010, 40(6): 679.