

RP-HPLC 测定盐酸氨溴索葡萄糖注射液中有有关物质

夏瑞, 代红, 车宝泉(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要: 目的 采用 RP-HPLC 测定盐酸氨溴索葡萄糖注射液中的有关物质。方法 采用 RP-HPLC, C₁₈ 柱, 以 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-甲醇(40:60)为流动相; 检测波长为 246 nm。结果 杂质 B 相对于盐酸氨溴索的校正因子为 1.47, 盐酸氨溴索和杂质 B 的最低检出限分别为 0.75 ng 和 1.5 ng, 盐酸氨溴索与其他杂质峰的分离度符合要求。结论 采用 RP-HPLC 测定盐酸氨溴索葡萄糖注射液中的有关物质方法简便、灵敏、专属性强。

关键词: 盐酸氨溴索; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2009)06-0496-03

Determination of Related Substances in Ambroxol Hydrochloride and Glucose Injection by RP-HPLC

XIA Rui, DAI Hong, CHE Baoquan(Beijing Municipal Institute of Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for the determination of related substance in ambroxol hydrochloride and glucose injection by RP-HPLC. **METHODS** The analysis was performed on a C₁₈ column. The mobile phase consisted of 0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution-methanol (40:60). The detection wavelength was 246 nm. **RESULTS** The response factor of impurity B relative to that of ambroxol hydrochloride was 1.47. Ambroxol hydrochloride and related substances could be well separated. The limit of detection of ambroxol hydrochloride and impurity B was 0.75 ng and 1.5 ng, respectively. **CONCLUSION** This method can be used to simultaneously separate and determine the related substances in ambroxol hydrochloride and glucose injection. It is simple and accurate.

KEY WORDS: ambroxol hydrochloride; HPLC

盐酸氨溴索葡萄糖注射液为祛痰平喘药。临床上用于伴有痰液不正常及排痰功能不良的急性、慢性呼吸道疾病, 如慢性支气管炎急性加重、喘息型支气管炎, 支气管扩张及支气管哮喘的祛痰治疗; 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(IRDS)的治疗。中国药典 2005 年版^[1]收载有盐酸氨溴索及其口服溶液、片剂、胶囊和缓释胶囊, 除口服溶液外, 均建立了液相色谱法测定其有关物质, 但盐酸氨溴索葡萄糖注射液尚未收载。目前, 盐酸氨溴索的分析方法有很多, 包括紫外分光光度法^[2-3]、高效液相色谱法^[4-6]以及液

相色谱-质谱联用^[7]等。但对盐酸氨溴索葡萄糖注射液中有有关物质的测定尚未见报道。另外, 中国药典针对盐酸氨溴索的有关物质测定方法中, 衍生了杂质 B 仅作为系统适用性试验中分离的要求, 药典中规定的检测波长为 248 nm, 而杂质 B 的最大吸收波长在 258 nm, 在两个波长下, 杂质 B 的峰面积差异较大。本试验中测定了杂质 B 相对盐酸氨溴索的校正因子, 并采用了衍生化方法对杂质 B 进行定位, 以方便在缺少杂质 B 对照品时仍能顺利检测, 建立的盐酸氨溴索葡萄糖注射液中盐酸氨溴索的有关物质的测定方法, 能有效地对盐酸氨溴

作者简介: 夏瑞, 女, 硕士毕业, 高级工程师 Tel: (010) 83229443 E-mail: xia_rui@yahoo.com

索和其他杂质进行分离。方法简单、快捷、灵敏度高,能满足盐酸氨溴索葡萄糖注射液中有关注物质的测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-20AT 液相色谱仪, SPD-M20A 紫外检测器, LC-20AT 泵, SIL-20AC 自动进样器以及 CBM-20A 系统控制器; 美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 2487 双波长紫外检测器。

盐酸氨溴索葡萄糖注射液由国内的四家制药企业提供, 分别为 A 有限公司(批号: 07011104, 07011106, 07011103, 规格为 100 mL: 盐酸氨溴索 15 mg 与葡萄糖 5 g); B 有限公司(批号: 20070201, 20070202, 规格为 100 mL: 盐酸氨溴索 30 mg 与葡萄糖 5 g); C 有限公司(批号: 061224161, 061223162, 061223263, 规格为 50 mL: 盐酸氨溴索 30 mg 与葡萄糖 2.5 g); D 有限公司(批号: 701051, 70120M3, 70120N3, 101182, 规格为 100 mL: 盐酸氨溴索 30 mg 与葡萄糖 5 g); 杂质 B 的对照品由某制药公司提供; 甲醇为色谱纯, 水为去离子水, 其他为分析纯。

2 实验方法

2.1 液相色谱条件

色谱柱: Diamond C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); Phenomenix C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-甲醇(40:60); 检测波长: 246 nm。

2.2 杂质 B 的衍生化制备

取盐酸氨溴索对照品适量加水制成每 1 mL 中含盐酸氨溴索 0.15 mg 的对照品溶液, 量取 3 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水 50 mL, 加甲醛(37%~40%)3 mL, 置 60 °C 水浴加热 5 min, 放冷, 加水至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为杂质 B 的定位溶液。

2.3 杂质 B 的校正因子测定

精密称取盐酸氨溴索对照品约 10 mg, 加水溶解稀释至 100 mL, 作为盐酸氨溴索对照品贮备液; 取杂质 B 对照品约 10 mg, 加甲醇稀释至 100 mL, 作为杂质 B 对照品贮备液; 分别精密量取上述贮备液适量, 加水稀释使最终浓度为每毫升含盐酸氨溴索和杂质 B 分别为 2 μg 和 4 μg; 3 μg 和 3 μg; 4 μg 和 2 μg(临用新制); 分别精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 在不同品牌的两台液相色谱仪和 3

根色谱柱测定了共计 6 组数据, 计算杂质 B 的校正因子为 1.47(RSD 为 2.70%)。

2.4 辅料溶液的配制

取 5% 葡萄糖在 100 °C 水浴中加热 30 min, 作为辅料溶液。

2.5 有关物质检查方法

取本品作为供试品溶液, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。分别精密量取供试品溶液及对照溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍, 供试品溶液色谱图中如出现与杂质 B 保留时间一致的色谱峰, 则其峰面积乘以 1.47 后与对照溶液主峰面积比较; 扣除辅料溶液中的色谱峰后的杂质峰为盐酸氨溴索的有关物质。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 流动相的选择 曾经选用磷酸二氢钾缓冲液-甲醇系统以及醋酸铵缓冲液-甲醇系统进行实验, 发现在磷酸二氢钾缓冲液-甲醇系统中, 盐酸氨溴索色谱峰对称性稍差, 采用三乙胺并同时用磷酸调节 pH 值, 峰形改善不大, 经过反复试验筛选, 确定流动相组成为 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-甲醇(40:60), 在该条件下, 色谱峰拖尾因子约为 1.03, 盐酸氨溴索与其他杂质峰能完全分离。见图 1。

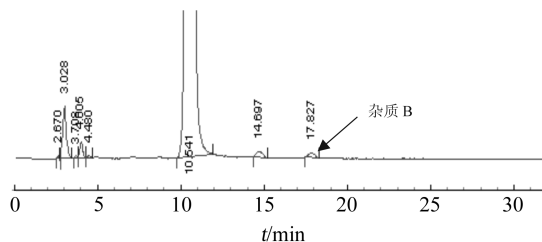


图 1 盐酸氨溴索葡萄糖注射液有关物质色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of ambroxol hydrochloride and glucose injection sample

3.1.2 色谱柱的选择 为方便使用和更具普遍性, 采用 C₁₈ 柱, 试验中考察了 Phenomenix C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Diamond C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 3 个品牌的色谱柱。盐酸氨溴索主峰与相邻峰的分度均符合要求, 盐酸氨溴索峰形对称。

3.1.3 检测波长选择 使用 DAD 检测器对盐酸氨溴索以及主要杂质的紫外光谱进行分析。盐酸氨溴索最大吸收波长在 246 nm, 保留时间为 14.697 min 的色谱峰最大吸收波长也在 246 nm, 杂质 B 的最大吸收波长为 258 nm。分别在波长 246 nm 和 258

nm测定样品中的杂质个数和杂质含量,发现在246 nm 波长处能检出更多的杂质,且杂质总量高,因此采用主峰的测定波长作为有关物质检查的测定波长,但杂质 B 在两个波长下峰面积相差较大,因此对杂质 B 的测定采用带校正因子的自身对照法,在波长246 nm 处,盐酸氨溴索峰与杂质 B 的峰纯度均大于0.99。

3.1.4 专属性 为验证分析方法对相关降解产物检查的专属性,对注射液进行了高温和强光强制降解试验。取注射液分别置强光(4 500±500)lx、60℃恒温烘箱的条件下放置,分别于10 d 取样,按“2.5”项下方法试验。光照和高温对盐酸氨溴索葡萄糖注射液均有影响,但产生的杂质均能与盐酸氨溴索完全分离。在上述色谱系统条件下,盐酸氨溴索与相邻峰的分离度符合要求,且盐酸氨溴索和杂质 B 的峰纯度均大于0.99。

3.1.5 辅料干扰试验 注射液中含有5%葡萄糖,分别对按工艺要求消毒、未消毒以及在100℃水浴中加热30 min 的5%葡萄糖注射液进行色谱分析(主要色谱峰为5-羟甲基糠醛,该色谱峰采用专有方法另行测定),发现在100℃水浴中加热30 min 后葡萄糖溶液色谱峰能反应产品中葡萄糖的杂质情况,并且对盐酸氨溴索杂质的测定没有干扰。见图2。

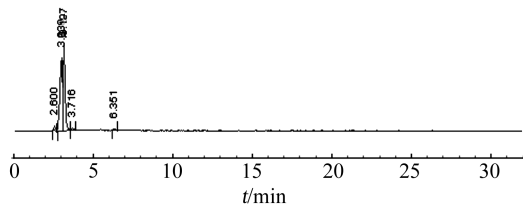


图2 5% 葡萄糖注射液在100℃水浴中加热30 min 后的色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of excipients(5% glucose injection heated at 100℃ for 30 min)

3.1.6 检测限 取盐酸氨溴索对照品用水配制成每1 mL 中含75 ng 的溶液,取杂质 B 对照品加甲醇溶解后用水进一步稀释至每1 mL 中含150 ng 的溶液,精密量取10 μL 注入液相色谱仪,峰高约为基线噪音的3 倍,因此盐酸氨溴索的检测限为0.75 ng,杂质 B 的检测限为1.5 ng。

3.2 样品测定

按上述色谱系统的有关物质检查方法测定 4 个厂家4 种规格的样品共12 批,见表1。

表1 盐酸氨溴索葡萄糖注射液有关物质检查结果

Tab 1 The contents of related substances in ambroxol hydrochloride and glucose injection

生产厂家	规格	批号	最大单个 杂质含量/%	杂质总量 /%
A 有限公司	100 mL: 盐酸 氨溴索 15 mg 与葡萄糖 5 g	07011104	0.36	1.04
		07011106	0.32	0.96
		07011103	0.50	1.18
B 有限公司	100 mL: 盐酸 氨溴索 30 mg 与葡萄糖 5 g	20070201	0.33	0.82
		20070202	0.34	0.87
C 有限公司	50 mL: 盐酸氨 溴索 30 mg 与 葡萄糖 2.5 g	061224161	0.30	0.53
		061223162	0.32	0.75
		061223263	0.34	0.63
D 有限公司	100 mL: 盐酸 氨溴索 30 mg 与葡萄糖 5 g	701051	0.45	1.17
		70120M 3	0.39	1.10
		70120N 3	0.38	1.12
		101182	0.37	0.89

3.3 结论

本试验中有关物质测定方法专属性强、灵敏度高、简便快捷,并且对不同品牌规格的C₁₈柱有良好的适用性。因此该方法适合用于盐酸氨溴索葡萄糖注射液中盐酸氨溴索有关物质的测定。

REFERENCES

[1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 560-563.

[2] WU Y T, DAI J Z, LIN G, et al. Determination of ambroxol hydrochloride tablets by UV[J]. Chin J Coal Ind Med(中国煤炭工业医学杂志), 2001, 4(5): 389-390.

[3] ZHENG M, SHEN H. Determination of ambroxol hydrochloride injection by UV[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2005, 17(5): 64-65.

[4] TANG N, ZHANG D, SUN W X, et al. Determination of the contents and related substances in Ambroxol hydrochloride orally disintegrating tablet by HPLC [J]. West China J Phram Sci(华西药学杂志), 2005, 20(6): 538-540.

[5] ZHANG Y J, GU D Z, TIAN S J. HPLC determination of content of ambroxol hydrochloride in oral solution of Losolven[J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2004, 24(6): 629-631.

[6] YE X C, WANG H Q, WU J, et al. Determination of ambroxol hydrochloride and its tablets by HPLC[J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2002, 22(10): 592-593.

[7] CHEN L, GAO S, LI J J, et al. HPLC-MS Determination of ambroxol hydrochloride and its pharmacokinetics and bioequivalence in human plasma[J]. Acta Acad Med Jiangxi (江西医学院学报), 2006, 146(6): 43-46.

收稿日期: 2008-06-30