

妥洛特罗原料药含量测定方法的比较

姬莉芳¹, 李清^{1*}, 毕开顺¹, 戴雯静¹, 韩笑¹, 何淑旺² (1.沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2.山东达因海洋生物制药股份有限公司, 北京 100025)

摘要: 目的 研究妥洛特罗原料药的含量测定方法。方法 非水滴定法以冰醋酸-醋酐(7:3)为溶剂, 结晶紫为指示液, 用高氯酸滴定液(0.1 mol·L⁻¹)滴定, 以电位法来判定滴定终点, 并将指示液在电位突跃时的颜色作为滴定终点颜色; 高效液相色谱法采用 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 乙腈-5 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾缓冲液(25:75)作为流动相, 检测波长为 215 nm。结果 非水滴定法与高效液相色谱法测定结果差异无统计学意义。结论 非水滴定法和高效液相色谱法均能有效地控制本品的含量, 为妥洛特罗原料药的质量控制提供科学依据。

关键词: 妥洛特罗; 含量测定; 非水滴定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)12-1493-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.12.017

Comparison of Determination Methods for Tulobuterol

Ji Lifang¹, Li Qing^{1*}, Bi Kaishun¹, Dai Wenjing¹, Han Xiao¹, He Shuwang² (1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shandong Dyne Marine Organism Pharmaceutical Stock Co., Ltd., Beijing 100025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare two methods for the determination of tulobuterol. **METHODS** Non-aqueous titration method was performed with acetic acid and acetic anhydride(7:3) as the solvent and crystal violet as indicator. The tulobuterol solution was titrated with 0.1 mol·L⁻¹ perchloric acid solution. The end point was decided by potentiometric method and indicator method. The HPLC method was performed on a C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-5 mmol·L⁻¹ phosphate buffer at flow-rate of 1 mL·min⁻¹. The detection was conducted at 215 nm. **RESULTS** There was no significant difference in accuracy between the results of HPLC and the nonaqueous titration method. **CONCLUSION** The results indicated that the two methods were simple, accurate and reproducible, and they both can be used to determine the content of tulobuterol.

KEY WORDS: tulobuterol; determination; non-aqueous titration; HPLC

妥洛特罗为临床上广泛使用的第 3 代选择性 β₂ 受体激动剂, 扩张支气管平滑肌的作用强而持久, 对心脏的兴奋作用较弱, 用于急慢性支气管哮喘和气道阻塞性疾病的长期维持治疗^[1]。妥洛特罗相对分子量较小, 脂溶性较强, 是较理想的透皮吸收药物。相对于口服制剂, 妥洛特罗控释贴片可以避免肝脏的首过效应, 同时能保持恒定和可控的血药浓度, 从而减轻不良反应, 提高患者用药的顺应性^[2-3]。

目前妥洛特罗在各国药典中尚未收载, 日本药局方(JP16)收载了妥洛特罗的盐酸盐, 其含量测定方法为非水滴定法^[4]。而有关妥洛特罗原料药含量测定的研究, 笔者未见国内外文献报道。本研究采用的非水滴定法, 与日本药局方测定盐酸妥

洛特罗含量的方法一致。此外, 建立了妥洛特罗含量测定的高效液相色谱法, 该法简便、快速、准确, 与非水滴定法比较^[5-6], 测定结果一致, 二者均可用于妥洛特罗原料药的含量测定。

1 仪器与试剂

pHS-25 型雷磁数显 pH 计, 雷磁 231-01 参比电极, 雷磁 231-01 玻璃电极(上海精密科学仪器有限公司); AB135-S 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

盐酸妥洛特罗对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100472-200401, HPLC 含量测定用); 妥洛特罗原料药(山东达因海洋生物制药股份有限公司, 批号: 25, 26, 27); 甲醇、乙腈为色谱纯(美

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-012)

作者简介: 姬莉芳, 女, 硕士生 Tel: (024)23986296 E-mail: summer296@163.com *通信作者: 李清, 女, 博士, 教授 Tel: (024)23986296 E-mail: lqyxm@hotmail.com

国 Fisher Scientific 公司); 实验用水为哇哈哈纯净水; 冰醋酸及其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 非水滴定法

2.1.1 高氯酸标准溶液的制备与标定 取无水冰醋酸(按含水量计算, 1 g 水加醋酐 5.22 mL) 800 mL, 加入 70%~72%高氯酸 8.5 mL, 摇匀, 在室温下缓缓滴加醋酐 24 mL, 边加边摇, 加完后再振摇均匀, 放冷。加无水冰醋酸适量成 1 000 mL, 摇匀, 放置 24 h, 即得。

取在 105 °C 干燥至恒重的邻苯二甲酸氢钾基准物, 约 0.16 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加无水冰醋酸 20 mL 溶解, 加结晶紫指示液 1 滴, 摇匀, 用高氯酸标准溶液缓慢滴定至蓝色, 并将滴定结果用空白试验校正。经计算, 该高氯酸标准溶液的浓度为 $0.1052 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 滴定终点指示剂颜色的确定 取妥洛特罗样品, 约 0.18 g, 精密称定, 置 100 mL 干燥烧杯中, 加冰醋酸-醋酐(7:3)20 mL 超声溶解后, 加结晶紫指示液 1 滴, 在磁力搅拌下用高氯酸标准溶液滴定, 记录消耗的滴定剂体积和相应的电位值, 以电位值-消耗滴定剂的体积作图, 得滴定曲线图, 见图 1(A)。对结果进行二阶导数处理, 见图 1(B)。

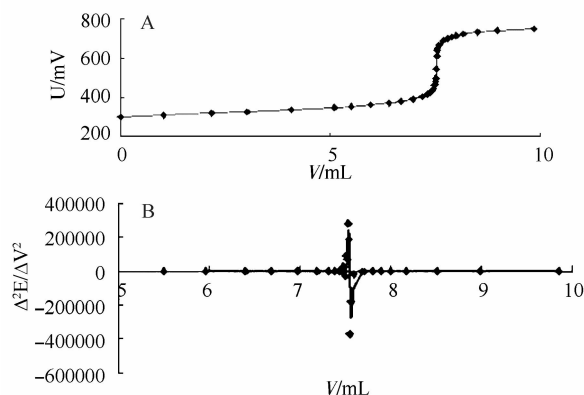


图1 妥洛特罗电位滴定曲线图

A-妥洛特罗电位滴定曲线; B-妥洛特罗电位滴定二阶导数曲线。

Fig. 1 Potentiometric titration curve of tulobuterol

A-potentiometric titration curve of tulobuterol; B-Second derivative potentiometric titration curve of tulobuterol.

2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 重复性试验 取妥洛特罗样品(批号: 25) 约 0.18 g, 6 份, 精密称定, 按样品测定项下方法测定含量, 计算得百分含量为 100.0%, RSD 为 0.04%。

2.1.3.2 稳定性试验 取妥洛特罗样品(批号: 25) 约 0.18 g, 6 份, 精密称定, 按样品测定项下方法测定含量, 考察供试品溶液室温放置 0, 1, 2, 3, 4, 6 h 的含量变化。测得妥洛特罗在不同时间的含量平均值为 100.1%, RSD 为 0.30%, 表明供试品溶液在室温下 6 h 稳定。

2.1.3.3 回收率试验 分别称取妥洛特罗样品约 0.144, 0.180, 0.216 g 各 3 份, 精密称定, 按样品测定项下方法测定含量, 计算低、中、高 3 种浓度回收率($n=3$)分别为 99.9%, 100.0%, 99.7%; RSD 分别为 0.12%, 0.06%, 0.12%, 计算平均回收率为 99.9%。

2.1.4 样品测定 取妥洛特罗样品约 0.18 g, 精密称定, 置 100 mL 干燥锥形瓶中, 加冰醋酸-醋酐(7:3)20 mL, 超声使药物溶解, 加结晶紫指示液 1 滴, 用高氯酸标准溶液滴定至亮蓝色, 记录消耗的滴定剂体积, 并将滴定结果用空白试验校正。计算样品中妥洛特罗百分含量, 结果见表 1。

2.2 高效液相色谱法^[7-8]

2.2.1 溶液的配制

2.2.1.1 供试品溶液 取妥洛特罗样品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 作为供试品储备液, 于 4 °C 冰箱保存。精密量取供试品储备液 5 mL 至 50 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 作为供试品溶液。

2.2.1.2 对照品溶液 取盐酸妥洛特罗对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解制成 1 mL 中约含妥洛特罗 100 μg 的溶液, 作为对照品储备液, 于 4 °C 冰箱保存。精密量取对照品储备液 5 mL 至 50 mL 溶液中, 加甲醇定容, 作为对照品溶液。

2.2.2 色谱条件与系统适用性 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动性为 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾缓冲液(取磷酸二氢钾 0.68 g, 加水稀释成 1 000 mL, 用磷酸调节 pH 至 2.4)-乙腈(75:25), 流速为 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 35 °C, 检测波长为 215 nm, 进样量为 20 μL 。在该色谱条件下妥洛特罗的保留时间为 6 min, 理论板数 $\geq 5\,000$, 拖尾因子符合要求。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 专属性试验 取供试品储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 分别经以下条件破坏: 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 3%过氧化氢溶液, 60 °C 高温 3 h, (4 500 $\pm$ 500)lx 的条件下放

置 10 d, 25 ℃相对湿度(90±5)%条件下放置 10 d。加甲醇稀释至 10 mL, 进样分析。经酸、碱、氧化、高温、光照及高湿破坏后, 药物仅在氧化破坏条

件下产生新的杂质和降解产物, 且杂质峰均能与主峰分离, 表明药物稳定, 方法专属性良好, 结果见图 2。

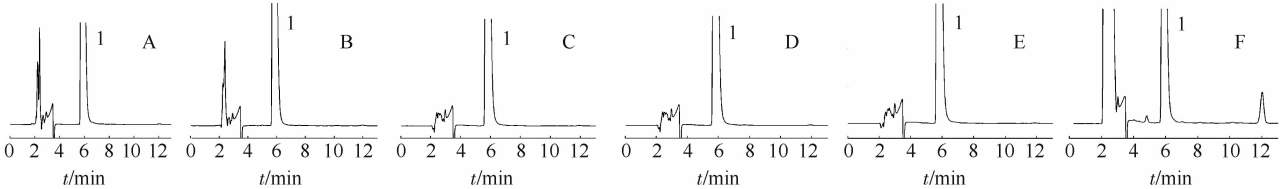


图 2 妥洛特罗高效液相色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-高温破坏; D-高湿破坏; E-强光破坏; F-氧化破坏; 1-妥洛特罗。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-degradation of products in 1 mol·L⁻¹ HCl solution; B-degradation of products in 1 mol·L⁻¹ NaOH solution; C-degradation of products under high temperature; D-degradation of products at high humidity; E-degradation of products under strong light; F-degradation of products in 3% H₂O₂ solution; 1-tulobuterol.

2.2.3.2 线性关系考察 分别精密量取盐酸妥洛特罗对照品储备液 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 摇匀。制得浓度约为 1, 5, 10, 15, 20 μg·mL⁻¹ 系列对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标进行线性回归, 得回归方程为: A=37.91C-2.03, r=0.999 9。表明妥洛特罗浓度在 1~20 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系。

2.2.3.3 检测限和定量限 取浓度为 0.5 μg·mL⁻¹ 对照品溶液, 用甲醇逐步稀释, 按信噪比 3:1 为最低检测限, 按信噪比 10:1 为定量限依法测定。妥洛特罗检测限为 8 ng·mL⁻¹, 定量限为 25 ng·mL⁻¹。

2.2.3.4 仪器精密度试验 取对照品溶液, 连续测定 5 次, 测得峰面积的 RSD 为 0.3%, 表明本方法的仪器精密度良好。

2.2.3.5 重复性试验 取同一批样品(批号: 25), 6 份, 按“2.2.1.1”项下方法制备供试品溶液并测定, 按外标法计算妥洛特罗含量, 测得平均含量为 99.7%, RSD 为 0.4%, 表明方法重复性良好。

2.2.3.6 稳定性试验 取“2.2.3.5”项下供试品溶液, 分别在室温下放置 0, 6, 12, 24, 36 和 48 h 后依法测定, 计算妥洛特罗峰面积 RSD 为 0.4%, 供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.3.7 回收率试验 精密称取已知含量(99.7%)的妥洛特罗原料药(批号: 25)9 份, 每份 25 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 分别精密加入盐酸妥洛特罗对照品适量, 按“2.2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算低、中、高 3 种浓度回收率(n=3)分别为 99.6%, 99.6%, 99.4%; RSD 分别为 0.15%,

0.10%, 0.15%, 计算平均回收率为 99.5%。

2.2.4 样品含量测定 分别称取不同批号的妥洛特罗样品, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液和对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件, 取供试品溶液与对照品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 按外标法计算供试品中妥洛特罗含量, 结果见表 1。经 t 检验表明 HPLC 与非水滴定法含量测定结果差异无统计学意义(P≥0.208)。

表 1 含量测定结果(n=3)

Tab. 1 Results of sample determination(n=3)

样品批号	含量/%					
	非水滴定法			HPLC		
25	100.0	100.0	100.1	99.7	99.3	100.1
26	99.8	99.9	100.4	99.8	99.6	99.9
27	99.9	99.8	100.1	99.6	99.9	99.8

3 讨论

本实验考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-磷酸二氢钾缓冲液等多个流动相系统。实验表明使用甲醇-水系统时峰形不好且响应低; 使用乙腈-水系统并在水相中加入适量的甲酸或磷酸时, 峰形和响应均有所改善, 但基线漂移严重; 使用乙腈-磷酸二氢钾缓冲液系统时, 峰形和响应较好。针对乙腈-磷酸二氢钾缓冲液体系, 考察了不同离子强度和 pH 值对主药色谱行为的影响, 结果显示离子强度对结果并无显著影响, 增加流动相的酸度可以改善主药色谱行为, 但进一步增加酸度会造成基线向下漂移, 为了保护色谱柱, 选择磷酸二氢钾浓度为 5 mmol·L⁻¹, 磷酸的量定为 0.05%, pH 值为 2.4。

妥洛特罗分子结构中具有仲胺氮, 显弱碱性, 将其溶于酸性溶剂中碱性增强, 可用强酸滴定。采取电位滴定法来确定滴定终点指示剂颜色的变化时, 发现在电位突变点指示剂颜色变化明显, 所以可以直接用指示剂法来进行滴定。使用冰醋酸和醋酐混合溶剂, 能够增大滴定突越, 选用分度值为 0.05 mL 的 10 mL 棕色滴定管, 保证了滴定的精度。

REFERENCES

- [1] FANG Y R, WANG Y, CHEN H B, et al. Clinical assessment of tulobuterol patches in the treatment of asthmatoïd diseases in infants and young children [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2012, 32(12): 951-954.
- [2] TIAN C H, WAN X Y, BI L Y. The effect of β_2 -agonist patch(especially tulobuterol) [J]. Progress in Japanese Medicine(日本医学介绍), 2003, 24(10): 444-445.
- [3] JI X X, GAO S. Study on the transdermal absorption containing tulobuterol [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2004, 22(6): 324-326.
- [4] JP 16(日本药局方第十六改正版) [S]. 2011: 890-891.
- [5] XU L J, CHEN X H, LIU Z B, et al. Determination content of imidol hydrochloride by HPLC and non-aqueous potentiometric titration [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(11): 1790-1792.
- [6] LIU Z M, LIU W S, CHEN X H, et al. Determination of tulobuterol in tulobuterol transdermal patch by HPLC [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2010, 30(12): 996-999.
- [7] LIU Y N, WANG W. Content determination of zafirlukast in zafirlukast tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 178-179.
- [8] LIU G X, PEI Z D, ZHANG J X, et al. Determination of contents and related substances of ecabet sodium granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(1): 70-72.

收稿日期: 2014-02-24

LC-MS/MS 测定人血浆中阿罗洛尔浓度

李力, 肖昌钱, 朱逢佳, 廉洪, 韩奇, 刘炜^{*}(浙江医院药剂科, 杭州 310013)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 方法测定人血浆中阿罗洛尔的浓度。方法 人血浆样品用乙酸乙酯提取后, 选用 ZORBAX Extend C₁₈(2.1 mm×100 mm, 3.5 μ m)色谱柱, 以乙腈-水(80:20, 含 0.1%甲酸)为流动相, 流速为 0.30 mL·min⁻¹, 采用电喷雾离子化源, 正离子方式, 多反应监测(MRM)扫描方式进行监测, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 372.3→315.9(阿罗洛尔)和 m/z 267.2→145.0(内标阿替洛尔)。结果 血浆中阿罗洛尔的线性范围为 0.5~1 000 ng·mL⁻¹($r=0.9952$), 定量下限为 0.5 ng·mL⁻¹; 日内、日间 RSD 均<15%; 低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为(80.6±1.6)%、(83.2±3.1)%和(87.5±4.5)%。结论 该方法快速、灵敏、准确, 专属性强, 重复性好, 适用于人血浆中阿罗洛尔浓度的测定, 可应用于阿罗洛尔的血药浓度检测和药动力学研究。

关键词: 阿罗洛尔; 液质联用; 血药浓度; 药动力学

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)12-1496-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.12.018

Determination of Arotinolol Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS

LI Li, XIAO Changqian, ZHU Fengjia, LIAN Hong, HAN Qi, LIU Wei^{*}(Department of Pharmacy, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a LC-MS/MS method for determination of arotinolol concentration in human-plasma.

METHODS The plasma samples were processed with ethyl acetate extraction and separated on ZORBAX Extend C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 3.5 μ m) and eluted with acetonitrile-water (80:20, containing 0.1% formic acid). Detection of the analyte was achieved using positive ion electrospray ionization (ESI) in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MS/MS ion transitions monitored were m/z 372.3→ m/z 315.9 and m/z 267.2→ m/z 145.0 for arotinolol and internal standard, respectively.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09303005); 国家自然科学基金(31201040)

作者简介: 李力, 男, 博士, 主管药师 Tel: (0571)81595229 E-mail: ronaldoli2001@163.com *通信作者: 刘炜, 女, 主任药师 Tel: (0571)81595179 E-mail: zjyytlw@163.com