

· 论 著 ·

反相高效液相色谱法测定吸入用异丙托溴铵溶液中的有关物质

卢来春, 张 蓉[△], 刘同华, 蒋学文

(第三军医大学新桥医院药学部, 重庆 400037)

摘要:目的 采用反相高效液相色谱法测定吸入用异丙托溴铵溶液中的有关物质。方法 色谱柱为 phenomenex-C8(4.6 mm×250mm, 5 μ m) 和 ultimate XB-C8(4.6mm×250mm, 5 μ m), 流动相 A 为乙腈-0.25% 庚烷磺酸钠溶液(29:71)用磷酸调 pH 值至 3.2, 流动相 B 为乙腈; 检测波长为 210nm; 流速为 1.0ml/min; 进样量 20 μ l。结果 异丙托溴铵与其有关物质能完全分离。结论 本方法准确、专属性强, 可用于吸入用异丙托溴铵溶液有关物质的测定。

关键词:反相高效液相色谱法; 异丙托溴铵; 有关物质

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2007)11-10672-02

RP-HPLC determination of related substances in Ipratropium Bromide Solution for Inhalation

L U Lai-chun, ZHANG Rong, LIU Tong-hua, et al.

(Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of related substances in Ipratropium Bromide Solution for Inhalation. **Methods** The chromatographic analysis was performed on a phenomenex-C8 (4.6mm×250mm, 5 μ m) and an ultimate XB-C8 (4.6mm×250mm, 5 μ m). The mobile phase A consisted of acetonitrile - 0.25% 1-heptanesulfonic acid, sodium salt (pH 3.2 was adjusted with phosphoric acid) (29:71); the mobile phase B consisted of acetonitrile. The detection wavelength was at 210 nm. The flow rate was 1.0 ml/min, with injection volume 20 μ l. **Results** The related substances could be separated from Ipratropium Bromide. **Conclusion** This method is accurate, specific and can be used for the quality control of Ipratropium Bromide Solution for Inhalation.

Key word: RP-HPLC; ipratropium bromide; related substances

异丙托溴铵是一种具有抗胆碱能(副交感)特性的四价铵化合物,可竞争性抑制乙酰胆碱对气道平滑肌的收缩作用。通过抑制细胞内 cGMP 生成,减少 cAMP 降解,降低细胞内钙离子浓度,使气道平滑肌松弛、肥大细胞释放炎性介质下降,终止气道扩张,呼吸阻力减小。吸入异丙托溴铵后,作用只限于肺部而扩张支气管,不作用于全身,主要采用气雾吸入给药^[1,2]。吸入用异丙托溴铵溶液由德国勃林格殷格翰国际公司研制生产,商品名“爱全乐”,在临床上应用较广泛,主要采用压缩雾化吸入或超声雾化吸入的方式给药。为了保证疗效,减少不良反应,提高药品质量,对该药的有关物质应有效控制,本文用高效液相色谱法测定了异丙托溴铵的有关物质。

1 仪器与材料

LG-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津公司);异丙托溴铵对照品购自浙江优联医药化工有限公司;托品酸购自苏州苏瑞医药化工有限公司;吸入用异丙托溴铵溶液(爱全乐)为德国勃林格殷格翰国际公司生产(批号 638066,规格为含异丙托溴铵 2ml:500mg);庚烷磺酸钠为分析纯试剂,纯度 $\geq 99\%$,购自上海亿日化工科技有限公司;乙腈为色谱纯;其他试剂为分析纯。

2 含量测定

2.1 色谱条件与系统适应性试验 参照文献^[3-5],选定色谱条件 C8 色谱柱(phenomenex-C8 5 μ m, 4.6mm×250mm 和 ultimate XB-C8 4.6mm×250mm, 5 μ m);流动相 A 为乙腈-0.25% 庚烷磺酸钠溶液(29:71)用磷酸调 pH 值至 3.2,流动相 B 为乙腈;洗脱梯度:0 \rightarrow 12min 10% B, 12 \rightarrow 20min 10% B \rightarrow 70% B, 20 \rightarrow 20.5min 70% B \rightarrow 10% B;检测波长为 210nm;流速为 1.0ml/min;进样量 20 μ l。理论板数按异丙托溴铵峰计算应不低于

2000,相邻杂质峰与主峰的分度应大于 1.5。

2.2 测定方法 取本品,用流动相 A 溶液稀释一倍制成的溶液作为供试品溶液;精密量取 1ml,置 100ml 量瓶中,用流动相 A 溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。取对照溶液 20 μ l,注入液相色谱仪,调节仪器灵敏度,使主峰高为满量程的 20%,再取供试品溶液 20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图至梯度洗脱程序完毕。色谱图中除溶剂峰外,如显杂质峰,与对照溶液主峰比较并计算。

3 专属性试验

3.1 主药与溶剂和托品酸的分离效能 取异丙托溴铵对照品适量,用流动相 A 溶液制成异丙托溴铵对照品溶液;取托品酸适量,用流动相 A 溶液制成托品酸溶液;取溴化钾适量,用流动相 A 溶液溶解制成溴化钾溶液。分别精密量取溶剂、托品酸溶液、异丙托溴铵对照品溶液、异丙托溴铵供试品溶液和溴化钾溶液各 20 μ l 进样,记录色谱图。结果表明,溶剂、托品酸和溴化钾均不影响本品有关物质检查。

3.2 酸破坏试验 取本品约 25ml 置 50ml 量瓶中,加 1mol/L 盐酸 10ml,加热煮沸 5min,酸碱中和后,用流动相 A 溶液稀释至刻度,摇匀,按前述色谱条件进样,记录色谱图。结果表明:该色谱系统对酸降解产物与主峰分离良好。

3.3 碱破坏试验 取本品约 25ml 置 50ml 量瓶中,加 1mol/L 氢氧化钠溶液 10ml,加热煮沸 5min,酸碱中和后,用流动相 A 溶液稀释至刻度,摇匀,按前述色谱条件进样,记录色谱图。结果表明:该色谱系统对碱降解产物与主峰分离良好。

3.4 高温破坏试验 取本品约 25ml 置 50ml 量瓶中,60 $^{\circ}$ C 加热 1h,用流动相 A 溶液稀释至刻度,摇匀,按前述色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,本品高温处理后,该色谱系统对主

[△] 通讯作者

峰与杂质峰的分离良好。

3.5 氧化破坏试验 取本品约 25ml 置 50ml 量瓶中,加 3% 双氧水 10ml,加热煮沸 5min 后,用流动相 A 溶液稀释至刻度,摇匀,按前述色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,该色谱系统对氧化降解产物与主峰分离良好。

综上所述,经过酸、碱、高温和氧化破坏后,均有部分降解产物产生。各降解产物峰与主峰均达到基线分离,说明该色谱条件可用于有关物质检测。

4 最低检测限和最低定量限

取异丙托溴铵对照品适量,精密称定,加溶剂溶解并稀释制成供试液,按上述色谱条件取 10 μ l 进样。经试验,当进样浓度为 0.3 μ g/ml 时,信噪比为 3:1,即最低检测限为 0.3 μ g/ml \times 10 μ l=3ng;当进样浓度为 1.0 μ g/ml 时,信噪比为 10:1,即最低检测限为 1.0 μ g/ml \times 10 μ l=10ng。

5 精密度试验

供试品溶液的精密性:取 3 批样品,按 2.2 项下的方法配制好的供试品溶液,按上述色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图,有关物质以总杂质的含量计算,RSD 为 3.05%。表明精密度良好。

6 重复性试验

取同样 3 批样品,按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样,以杂质的百分含量计算,RSD 为 2.31%,表明该法重复性较好。

7 稳定性试验

取同一份配制好的异丙托溴铵样品溶液,在 12h 内每隔 3h 进样测定 1 次,测得供试品溶液中异丙托溴铵的浓度 RSD 为 1.30%,结果表明在 12h 内样品溶液稳定性较好。

8 耐用性试验

用两种色谱柱(phenomenex-C8 5 μ m,4.6mm \times 250mm 和 ultimate XB-C8 4.6mm \times 250mm,5 μ m),分别对异丙托溴铵中有关物质进行测定,记录的色谱图峰形均良好,理论塔板数按异丙托溴铵计均在 3000 以上,异丙托溴铵与相邻的峰的分度均在 1.5 以上。

9 样品有关物质的测定

取批号为 638066 的样品按上述色谱条件测定,扣除溶剂峰和溴离子峰,计算有关物质,结果最大单个杂质为 0.35%;杂质总量为 1.52%。

10 讨论

异丙托溴铵在溶液状态下,其溴以离子形式存在^[4],在 210nm 处有一定紫外吸收。为验证该测定方法在溴离子存在的情况下不影响异丙托溴铵的含量测定,故选定溴化钾进行了试验。试验表明,采用该测定方法,溴离子本身不保留,出峰的时间比较靠前,因此溴离子不干扰异丙托溴铵的有关物质测定。

经过破坏性试验产生的杂质峰,均能较好的分离,说明本方法用于吸入用异丙托溴铵溶液的有关物质测定时能分离产生的杂质。

在本品有关物质测定的色谱图中,异丙托溴铵峰峰形良好,异丙托溴铵峰与相邻的峰之间的分离度也均>1.5,因此本方法可以作为吸入用异丙托溴铵溶液有关物质测定的方法。

参考文献:

- [1] 付笑飞,姚尚龙.异丙托溴铵的药理基础及临床应用现状[J].华中医杂志,2005,29(2):139.
- [2] 毛惠丽,焦常海.必可特雾化吸入佐治小儿毛细支气管炎的疗效观察[J].重庆医学,2004,33(9):1398.
- [3] Simms PJ, Towne RW, Gross CS, et al. The separation of ipratropium bromide and its related compounds [J]. J Pharma Biomed Anal, 1998, 17: 841.
- [4] 汪洁.吸入液中异丙托溴铵和苯扎氯铵的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志,1996,27(9):413.
- [5] 谭生建,张启明,刘刚,等.高效液相色谱法测定复方异维倍克气雾剂中异丙托溴铵和盐酸克仑特罗的含量[J].药物分析杂志,2005,25(9):1070.

(收稿日期:2006-12-10)

(上接第 1066 页)

HBV 再感染的有效性已得到证实,但部分研究者仍开始尝试以其他方案替代 LMV/HBIg 方案序贯治疗。LAM 单药是最常见的方案,根据术前患者 HBV 复制状态,经过 LAM/HBIg 方案治疗 6~24 个月后,进行治疗方案的转换,多数作者报道疗效良好,与继续 LAM/HBIg 方案者差异不显著^[9]。本组中 6 例患者术后 8~14 个月自行停用 HBIg,目前无 1 例发生再感染,进一步转归有待观察。主动免疫也受到研究者的关注,对经严格挑选的患者(术后 24 个月以上,处于较低免疫抑制水平)以基因工程重组乙型肝炎疫苗进行免疫,HBsAb 阳性率可达 28.15%~82.15%,同时使用免疫佐剂可提高阳性率。

参考文献:

- [1] Sameul D. Liver transplantation and hepatitis B virus infection: the situation seems to be under control, but the virus is still there [J]. J Hepatol, 2001, 34: 943.
- [2] Starkel P. Limited lamivudine and longterm hepatitis B immunoglobulin immunoprophylaxis for prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation [J]. Transplantation, 2002, 74(3): 408.

- [3] 杨明,王惠,陈佐江,等.乙肝病毒相关性肝病肝移植术后乙肝病毒再感染的防治[J].消化外科,2004,3(3):157.
- [4] Lok AS. Prevention of recurrent hepatitis B post-liver transplantation [J]. Liver Transplantation, 2002, 8: S67.
- [5] 朱晓峰,陆敏强,蔡常洁,等.肝移植后乙肝复发的预防和治疗 [J]. 消化外科,2002,1: 37.
- [6] Muller R. Liver transplantation in HBs antigen (HBsAg) carriers. Prevention of hepatitis B virus (HBV) recurrence by passive immunization [J]. J Hepatol, 1991, 13: 90.
- [7] 陈伟,邓少丽,陈迎春,等.拉咪味定治疗后乙肝病毒发生 YMDD 变异的研究 [J]. 重庆医学,2003,32(12): 1617.
- [8] Schmilovitz-Weiss H. Treatment for acute severe hepatitis B: a pilot study [J]. Liver Int, 2005, 196.
- [9] Bienze U. Successful hepatitis B vaccination in patients who underwent transplantation for hepatitis B virus-related cirrhosis: preliminary results [J]. Liver Transplantation, 2002, 8: 562.

(收稿日期:2006-10-25)