

# HPLC法检查不同厂家盐酸氨溴索口服溶液的有关物质

陈阳\*, 金薇, 杨永健<sup>#</sup>(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1207-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.19

**摘要** 目的:建立测定多厂家盐酸氨溴索口服溶液中有关物质(包括6种已知杂质化合物1~6)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法测定20个厂家161批样品的有关物质。色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>,流动相A为醋酸铵缓冲液(pH 8.7)-甲醇(8:2),流动相B为乙腈-甲醇(8:2),梯度洗脱,流速为1.0 ml/min,检测波长为245 nm,柱温为40 ℃。对6种已知杂质进行外标法定量。结果:在建立的色谱条件下,盐酸氨溴索、6种已知杂质和5种防腐剂均能达到良好分离;6种杂质线性关系良好, $r$ 均>0.999 5,回收率为85.4%~113.7%,检测限均小于5 ng。结论:该方法专属性好、灵敏度高、结果准确,可用于盐酸氨溴索制剂的有关物质考察。

**关键词** 高效液相色谱法;厂家;盐酸氨溴索口服溶液;有关物质

## Study of Related Substances in Ambroxol Hydrochloride Oral Solution from Different Manufacturers by HPLC CHEN Yang, JIN Wei, YANG Yong-jian(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances (including 6 known impurities, ie. compound 1, 2, 3, 4, 5, 6) in Ambroxol hydrochloride oral solution from different manufacturers. METHODS: The related substances in 161 batches of samples from 20 manufacturers were determined by HPLC. Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> column was adopted with mobile phase A consisted of ammonium acetate buffer (pH 8.7)-methanol (8:2) and mobile phase B consisted of acetonitrile-methanol (8:2) with gradient elution at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 245 nm, the temperature of column was 40 ℃, and external standard method was used to quantify 6 known impurities. RESULTS: Ambroxol hydrochloride, 6 known impurities and 5 preservatives were separated well under the chromatographic condition. 6 impurities were good in linear range ( $r > 0.999 5$ ). The recoveries were from 85.4% to 113.7%, and the detection limits were all less than 5 ng. CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive and accurate, and can be used for the determination of related substances in Ambroxol hydrochloride preparations.

**KEY WORDS** HPLC; Manufacturers; Ambroxol hydrochloride oral solution; Related substances

曲尼司特的作用机制为抑制肥大细胞和嗜碱细胞释放化学介质,能抑制肥大细胞和嗜碱细胞的磷酸二酯酶,使细胞内环磷酸腺苷的水平升高,进入细胞的游离钙减少,稳定细胞膜,防止其细胞脱颗粒和释放组胺等化学介质<sup>[7-9]</sup>。而本品可直接作用于鼻腔黏膜上皮细胞,能够更快速、直接地稳定鼻腔内黏膜细胞膜,防止其细胞脱颗粒和释放组胺等化学介质,对缓解喷嚏、鼻痒、流涕和鼻塞的四大症状具有积极的作用,以达到治疗目的。

综上所述,该制剂配方合理,制备工艺简单,稳定性良好,质量控制方法简便、准确。

### 参考文献

- [1] Koda A, Nagai H, Watanabe S, *et al.* Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, *N*(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (*N*-5') [J]. *J Allergy and Clin Immunol*, 1976, 57(5): 396.
- [2] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 15版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 416, 562.

- [3] 倪冲, 缪玉山, 陈围明, 等. 曲尼司特滴眼液的研制及质量研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(12): 886.
- [4] 倪冲, 缪玉山, 陈围明, 等. 高效液相色谱法测定曲尼司特滴眼液中曲尼司特及其有关物质的含量[J]. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(5): 365.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录VIH、附录IR.
- [6] 叶勇, 晏亦林, 张健泓. RP-HPLC法测定甲磺酸酚妥拉明滴鼻剂中甲磺酸酚妥拉明的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(28): 2 680.
- [7] Komatsu H, Kojima M, Tsutsumi N, *et al.* Study of the mechanism of inhibitory action of tranilast on chemical mediator release[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1988, 46(1): 43.
- [8] Suzawa H, Kikuchi S, Ichikawa K, *et al.* Inhibitory action of tranilast, an anti-allergic drug, on the release of cytokines and PGE2 from human monocytes-macrophages [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1992, 60(2): 85.
- [9] Kawano Y, Noma T. Cell action mechanism of tranilast--effect on the expression of HLA-class II antigen[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1993, 15(4): 487.

(收稿日期:2012-06-08 修回日期:2012-07-02)

\* 主管药师。研究方向:药物分析。电话:021-38839900-26316。E-mail: ycmirror@163.com

<sup>#</sup> 通信作者:主任药师, 硕士。研究方向:药物分析。电话:021-38839900。E-mail: yongjianyang@163.com

盐酸氨溴索是一种黏液溶解药,能明显促进肺表面活性物质的生成,增强支气管纤毛的排空运动,对急慢性呼吸道疾病特别是慢性支气管炎具有祛痰作用。由于其毒性低、祛痰作用强,已成为目前最常用的非处方祛痰药物之一<sup>[1-2]</sup>。

盐酸氨溴索口服溶液为2010年版《中国药典》二部收载品种<sup>[3]</sup>,国内生产厂家很多,由于各厂家的处方工艺各不相同,所含甜味剂、防腐剂、香精等辅料存在较大差异,因此2010年版《中国药典》标准未规定有关物质检查项。笔者亦未见其有关物质的相关文献报道。为此,本文建立了盐酸氨溴索口服溶液有关物质检查的高效液相色谱(HPLC)法,并用于国家评价性抽检中不同厂家产品的质量考察<sup>[4]</sup>。

## 1 材料

HP1100型HPLC仪(美国Agilent公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

盐酸氨溴索对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100599-200502,纯度:100%);化合物1、2、3、4、5、6杂质对照品(上海勃林格殷格翰药业有限公司,批号分别为:0006、0004、0004、0003、0007、0004,纯度分别为93.0%、95.4%、96.5%、96.1%、99.9%、99.1%);盐酸氨溴索口服溶液[系来自20个厂家(编号为A~T)的161批样品,浓度:0.3%、0.6%,包装规格:5、10、20、60、100 ml等多种];乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>(25 cm×4.6 mm, 5 μm),流动相A为醋酸铵缓冲液(取醋酸铵1.0 g,加水1 000 ml使溶解,用氨水调节pH值至8.7)-甲醇(8:2, V/V),流动相B为乙腈-甲醇(8:2, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为245 nm,柱温为40 ℃,进样体积为20 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间, min	流动相A比例, %	流动相B比例, %
0~15	74	26
<15~36	74~45	26~55
<36~37	45	55
<37~37.1	45~74	55~26
<37.1~42	74	26

### 2.2 杂质对照品溶液的制备

取化合物1、2、3、4、5、6杂质对照品各适量,精密称定,用稀释剂[醋酸铵缓冲液(pH 8.7)-乙腈-甲醇(55:25:20, V/V/V)]溶解并定量稀释制成每1 ml中均含3 μg的溶液,即得。杂质对照品溶液的色谱见图1。

### 2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品适量(约相当于盐酸氨溴索6 mg),置于10 ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验。取盐酸氨溴索、化合物1~6对照品、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲酸、山梨酸各适量,用稀释剂溶解并稀释制成每1 ml中分别含30、3、3、3、3、3、40、40、40、40 μg的溶液,进样测定。结果,5种防腐剂峰与其余7种组分峰均可达到完全分离,分离度均大于4,系统适用性良好。系统适用性试验色谱图见图2。

2.4.2 检测限。取盐酸氨溴索、化合物1~6对照品各适量,精

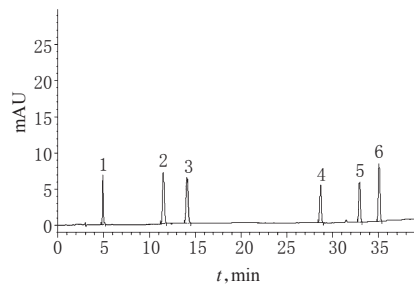


图1 杂质对照品溶液的高效液相色谱图

1. 化合物5; 2. 化合物2; 3. 化合物4; 4. 化合物1; 5. 化合物3; 6. 化合物6  
Fig 1 HPLC chromatograms of impurity control solution  
1. compound 5; 2. compound 2; 3. compound 4; 4. compound 1; 5. compound 3; 6. compound 6

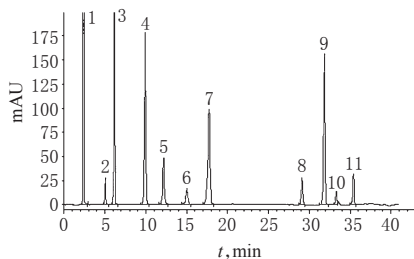


图2 系统适用性试验高效液相色谱图

1. 苯甲酸和山梨酸; 2. 化合物5; 3. 羟苯甲酯; 4. 羟苯乙酯; 5. 化合物2; 6. 化合物4; 7. 羟苯丙酯; 8. 化合物1; 9. 盐酸氨溴索; 10. 化合物3; 11. 化合物6

Fig 2 HPLC chromatograms of system suitability test

1. benzoic acid and sorbic acid; 2. compound 5; 3. methylparaben; 4. ethylparaben; 5. compound 2; 6. compound 4; 7. propylparaben; 8. compound 1; 9. ambroxol hydrochloride; 10. compound 3; 11. compound 6

密称定,用稀释剂溶解并定量稀释制成每1 ml中分别含6、3、3、3、3、3 μg的溶液;取此溶液,用稀释剂逐步稀释后进样,根据各组分峰的信噪比为3时所对应的质量浓度计算其检测限,结果见表2。

表2 检测限、精密度和回收率试验结果

Tab 2 Results of limit of detection, precision and recovery test

组分	检测限, ng	精密度(n=6)RSD, %	回收率(n=4), %
盐酸氨溴索	2.3		
化合物1	4.9	0.1	112.2
化合物2	3.1	0.3	113.7
化合物3	4.8	1.4	85.4
化合物4	4.3	0.3	92.9
化合物5	3.2	0.5	102.6
化合物6	3.5	0.6	102.0

2.4.3 线性关系考察。取化合物1~6对照品各适量,加稀释剂溶解并稀释制成每1 ml中均含30 μg的溶液,作为线性贮备溶液;精密量取1.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0和10.0 ml,分别置于50 ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀后分别进样。以各组分峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标绘制标准曲线,回归方程和相关系数见表3。

表3结果表明,在一定的范围内,各杂质峰峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, r均>0.999 5。

2.4.4 精密度试验。取“2.2”项下杂质对照品溶液,重复进样6

表3 线性试验结果

Tab 3 Results of linearity test

组分	质量浓度范围, $\mu\text{g/ml}$	回归方程	相关系数 $r$
化合物1	0.602 6~6.026	$A=20.73c-0.18$	0.999 5
化合物2	0.581 9~5.819	$A=32.87c-1.02$	0.999 5
化合物3	0.621 5~6.215	$A=19.25c+0.05$	0.999 6
化合物4	0.670 8~6.708	$A=29.32c-0.63$	0.999 6
化合物5	0.627 4~6.274	$A=15.88c-0.47$	0.999 5
化合物6	0.666 0~6.660	$A=27.46c-0.31$	0.999 6

次,各组分峰面积的RSD结果见表2,表明方法的精密度良好。

2.4.5 加样回收试验。取2个不同厂家的样品分别进行试验。精密量取本品2 ml,置于10 ml量瓶中,精密加入“2.4.3”项下的线性贮备溶液1 ml,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,进样测定,各组分的回收率结果见表2。

2.4.6 溶液的稳定性。取“2.2”项下的杂质对照品溶液,每间隔一定时间分别进样。结果,在17 h内,化合物3峰面积逐渐减小,RSD=1.8% ( $n=8$ );其他各组分均无明显变化,RSD均<0.7% ( $n=8$ )。表明对照品溶液稳定性不佳,需临用新制,在17 h内尽快测定。

取“2.3”项下的供试品溶液,每间隔一定时间分别进样。结果,在20 h内,化合物3含量缓慢增加,其他组分中仅检出化合物1 ( $n=6$ );主成分含量无明显变化,RSD=2.5% ( $n=6$ )。表明供试品溶液制备后应在6 h内尽快测定。

2.4.7 方法的专属性。取本品,分别进行酸、碱、氧化、高温、光照等强破坏试验。(1)酸破坏:量取本品(浓度规格为0.3%) 2 ml,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液0.2 ml,放置过夜,用1 mol/L氢氧化钠溶液中和,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。(2)碱破坏:量取本品2 ml,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液0.2 ml,放置过夜,用1 mol/L盐酸溶液中和,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。(3)氧化破坏:量取本品2 ml,置于10 ml量瓶中,加浓过氧化氢溶液0.2 ml,放置过夜,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。(4)高温破坏:取本品,105  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置过夜,冷却后量取2 ml,置于10 ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。(5)光照破坏:取本品,同时置于2个紫外光灯(254、365 nm)下放置过夜,量取2 ml,置于10 ml量瓶中,用稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

结果,本品在以上条件下均有不同程度的降解产物生成,且均能与6种已知杂质峰达到良好分离,表明方法的专属性良好。其中高温破坏试验色谱见图3,其余色谱图略。

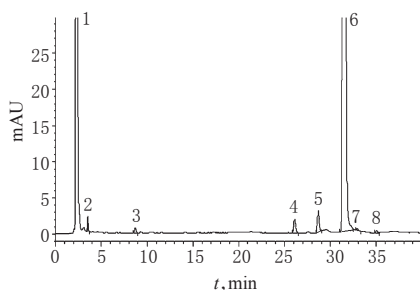


图3 高温破坏试验高效液相色谱图

1.苯甲酸;2,3,4.未知杂质;5.化合物1;6.盐酸氨溴索;7.化合物3;8.化合物6

Fig 3 HPLC chromatograms of damage test by high temperature

1.benzoid acid; 2, 3, 4.unknown impurities; 5.compound 1; 6.ambroxol hydrochloride; 7.compound 3; 8.compound 6

另取各厂家制剂处方中使用到的蔗糖、柠檬酸、山梨醇等22种辅料,分别制备各自的单辅料溶液,进样测定。结果表明,各辅料对6种已知杂质峰均无明显干扰,不影响测定。其中蔗糖单辅料溶液的色谱见图4,其余色谱图略。

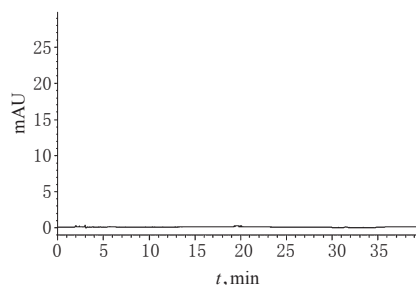


图4 蔗糖单辅料溶液的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of single excipient solution of sucrose

### 2.5 样品中有关物质测定

取20个厂家共161批盐酸氨溴索口服溶液样品,分别测定,计算6种已知杂质的量,结果见表4(表中“N/D”表示未检出)。

表4 不同厂家样品中各已知杂质的测定结果

Tab 4 Results of each known impurities in samples from different manufacturers

生产厂家	总批次	化合物1,%	化合物2,%	化合物3,%	化合物4,5,6,%
厂家A	10	0.04~0.10	0~0.07	0~0.07	N/D
厂家B	11	0.10~0.14	0~0.02	0~0.22	N/D
厂家C	9	0.39~0.47	N/D	0~0.08	N/D
厂家D	17	0.26~1.43	N/D	0~1.09	N/D
厂家E	27	0.11~0.24	N/D	0~0.03	N/D
厂家F	7	0.10~0.22	N/D	0~0.07	N/D
厂家G	3	0.04~0.05	N/D	0.04~0.06	N/D
厂家H	4	0.17~0.27	N/D	N/D	N/D
厂家I	18	0.07~0.17	N/D	0~0.05	N/D
厂家J	8	0.08~0.15	N/D	0.1~0.26	N/D
厂家K	8	0.11~0.14	N/D	N/D	N/D
厂家L	4	0.39~0.54	N/D	0.16~0.65	N/D
厂家M	4	0.18~0.24	N/D	N/D	N/D
厂家N	8	0.07~0.13	N/D	N/D	N/D
厂家O	6	0.06~0.22	N/D	N/D	N/D
厂家P	6	0.07~0.08	N/D	N/D	N/D
厂家Q	1	0.51	N/D	N/D	N/D
厂家R	6	0.07~0.08	N/D	N/D	N/D
厂家S	3	0.12~0.13	0~0.06	N/D	N/D
厂家T	1	0.54	N/D	N/D	N/D

### 3 讨论

本品为口服溶液剂,各个厂家的处方工艺和所用辅料各不相同,相同色谱条件下空白辅料峰也各不相同,由此给供试品中可能存在的未知杂质峰的归属和定量带来一定的困难,因此本研究中仅针对6种已知杂质。

6种已知杂质为盐酸氨溴索原料药的主要杂质,其中化合物1为2010年版《中国药典》(二部)盐酸氨溴索及其制剂中的杂质B<sup>[9]</sup>,化合物6为其顺式异构体。盐酸氨溴索与已知杂质化合物1,6的分子结构式见图5(由于涉密原因,其余已知杂质的分子结构式未列出)。

20个厂家的处方中使用了羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、山梨酸、苯甲酸等5种常用防腐剂<sup>[9]</sup>,且浓度均较高,可能影

# RP-HPLC法测定注射用长春西汀的有关物质

袁利杰\*, 杨本霞, 陈杰(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.2;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1210-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.20

**摘要** 目的:建立测定注射用长春西汀中有关物质(包括已知杂质长春胺乙酯、阿朴长春胺、甲氧基长春西汀和其他杂质)的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Agela C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.2 mol/L 醋酸铵溶液(60:40), 流速为 1.0 ml/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 273 nm。结果:在选定的色谱条件下,主成分与有关物质能完全分离,长春胺乙酯、阿朴长春胺、甲氧基长春西汀检测质量浓度线性范围分别为 1.616~8.080、2.844~14.220、0.808 0~4.848 0 μg/ml(*r*均为 0.999 8),加样回收率(*n*=9)分别为 99.7%、100.5%、99.7%,RSD分别为 1.3%、0.7%、1.0%,检测限分别为 2.323、1.138、2.323 ng。结论:该方法灵敏度高、专属性强、精密性好,能够有效控制注射用长春西汀中的已知杂质和其他有关物质的含量。

**关键词** 注射用长春西汀;有关物质;反相高效液相色谱法

## Determination of Related Substances in Vinpocetine for Injection by RP-HPLC

YUAN Li-jie, YANG Ben-xia, CHEN Jie(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances (known impurities including ethylvincamate, apovincamine, methoxyvinpocetine and other impurities) in Vinpocetine for injection. METHODS: RP-HPLC method was adopted. Agela C<sub>18</sub> column was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2 mol/L ammonium acetate solution (60:40) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column was maintained at 30 ℃ and detection wavelength was set at 273 nm. RESULTS: Related substances were completely separated from the main constituent. The linear range was 1.616-8.080 μg/ml for ethylvincamate (*r*=0.999 8), 2.844-14.220 μg/ml for apovincamine (*r*=0.999 8) and 0.808 0-4.848 0 μg/ml for methoxyvinpocetine (*r*=0.999 8). The average recoveries were 99.7% (RSD=1.3%), 100.5% (RSD=0.7%) and 99.7% (RSD=1.0%), respectively (*n*=9). The detection limits were 2.323, 1.138 and 2.323 ng, respectively. CONCLUSIONS: The sensitivity, precision and specificity of method can satisfy the requirements. It can be used for the quality control of known impurities and other related substance in Vinpocetine for injection.

**KEY WORDS** Vinpocetine for injection; Related substances; RP-HPLC

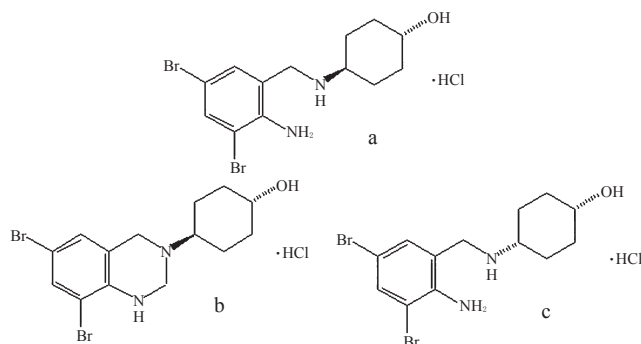


图5 盐酸氨溴索与部分已知杂质的分子结构式

a. 盐酸氨溴索; b. 化合物 1; c. 化合物 6

Fig 5 Molecular structure of ambroxol hydrochloride and partial known impurities

a. ambroxol hydrochloride; b. compound 1; c. compound 6

响有关物质的检查,因此“2.4.1”项下的系统适用性试验主要考察主成分、6种已知杂质和5种防腐剂的分离效果。

2010年版《中国药典》(二部)中盐酸氨溴索及其制剂均采

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 化学药品分析及质量标准。

E-mail: yuanlij@126.com

用等度洗脱的HPLC法进行含量测定和有关物质检查<sup>[3]</sup>,该色谱系统无法保证本品中多组分的有效分离。采用梯度洗脱法,可以使盐酸氨溴索主成分与各已知杂质、各防腐剂之间得到良好分离,更有利于有关物质的检查,提高测定结果准确度。本文的色谱系统也已经用于国家评价性抽验中盐酸氨溴索糖浆、颗粒、口腔崩解片等其他制剂的有关物质考察。

综上,该方法专属性好、灵敏度高、结果准确,可用于盐酸氨溴索制剂的有关物质考察。

### 参考文献

- [1] 范国荣,李珍,胡晋红,等.盐酸氨溴索口服溶液的相对生物利用度研究[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(2):105.
- [2] 王曦,何海霞.2种盐酸氨溴索制剂的人体生物等效性研究[J].中国药房,2011,22(6):516.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:766.
- [4] 王斌,李仲苇,钟明康,等.盐酸氨溴索注射剂质量考察[J].药物分析杂志,2006,26(10):1448.
- [5] 李小安,吴少平,刘海静,等.盐酸氨溴索口服溶液中苯甲酸钠的含量测定方法学研究[J].安徽医药,2011,15(1):40.

(收稿日期:2012-06-18 修回日期:2012-07-11)