

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.02.008

◇ 药物分析 ◇

## 高效液相色谱法测定硫酸沙丁胺醇有关物质的含量

王鑫<sup>1</sup>, 刘宏大<sup>2</sup>, 薛雁<sup>2</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 邸伟庆<sup>2</sup>作者单位:<sup>1</sup>蓬莱诺康药业有限公司, 山东 蓬莱 265600; <sup>2</sup>辽宁远大诺康生物制药有限公司, 辽宁沈阳 110171

通信作者: 刘宏大, 女, 副高级工程师, 研究方向为药物制剂, E-mail: Liuhongda@nkbp.com

**摘要:**目的 建立硫酸沙丁胺醇原料药有关物质的检测方法。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定。色谱柱为Hypersil Gold C<sub>8</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相A为3.45 g一水合磷酸二氢钠用900 mL 0.05%的三乙酸胺溶液溶解, 以稀磷酸调节pH至3.0之后用0.05%的三乙酸胺溶液定容至1 000 mL; 流动相B为甲醇:乙腈(体积比20:80), 进行梯度洗脱; 流速为1.0 mL/min, 检测波长为273 nm, 柱温为25 ℃。结果 在该色谱条件下, 硫酸沙丁胺醇及杂质A、B、C、D、E、F、G、K、M、O、L、Q、I、J均能有效分离, 分离度均大于1.5; 并且硫酸沙丁胺醇及杂质C、D、F、M、O在0.45~18.0 μg/mL内质量浓度与峰面积线性关系良好, 回收率分别为杂质C为99.1%, RSD为2.6%(n=9); 杂质D为99.3%, RSD为2.1%(n=9); 杂质F为100.1%, RSD为2.5%(n=9); 杂质M为100.5%, RSD为1.7%(n=9); 杂质O为100.2%, RSD为1.9%(n=9)。结论 该方法专属性强, 适用于硫酸沙丁胺醇原料药有关物质检测。

**关键词:**沙丁胺醇/分析; 药物污染; 回收率; 色谱法, 高压液相

## HPLC method was used to determine the content of albuterol sulfate

WANG Xin<sup>1</sup>, LIU Hongda<sup>2</sup>, XUE Yan<sup>2</sup>, LI Ping<sup>1</sup>, DI Weiqing<sup>2</sup>

Author Affiliations: <sup>1</sup>Penglai Nuokang Pharmaceutical Co.Ltd, Penglai, Shandong 265600, China; <sup>2</sup>Liaoning Grand Nuokang Biopharmaceutical Co.LTD, Shengyang, Liaoning 110171, China

**Abstract: Objective** To establish a method for detecting substances related to albuterol sulphate. **Methods** HPLC method was used for determination. Chromatographic column for Hypersil Gold C<sub>8</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 3 microns), A 3.45 g mobile phase monohydrate sodium dihydrogen phosphate, with 900 mL. Three acetic acid amine solution of 0.05%, with A dilute phosphoric acid to adjust pH to 3.0 after three acetic acid with 0.05% of the amine solution constant volume to 1 000 mL; the flow phase B is methanol: acetonitrile (volume ratio 20:80), gradient elution; the velocity is 1.0 mL/min, the detection wavelength is 273 nm, and the column temperature is 25. **Results** In this chromatographic condition, salbutamol sulfate and impurities A, B, C, D, E, F, G, K, M, O, L, Q, I, J can be effectively separated, and the chromatographic resolution is greater than 1.5. In addition, salbutamol and impurities C, D, F, M and O are in good linear relationship with the peak area in 0.45%-18.0. The recovery rate of impurities C was 99.1%, and the RSD was 2.6% (n=9). The recovery rate of impurities D is 99.3%, and RSD is 2.1% (n=9). The recovery rate of impurities F was 100.1%, RSD was 2.5% (n=9). The recovery rate of impurities M was 100.5%, and RSD was 1.7% (n=9). The recovery rate of impurities O was 100.2% and RSD was 1.9% (n=9). **Conclusion** This method has strong specificity and is suitable for the detection of substances related to albuterol sulfate.

**Key words:** Albuterol/analysis; Drug contamination; Retrieving rate; Chromatography, high pressure liquid

硫酸沙丁胺醇为选择性β<sub>2</sub>受体的激动剂, 能选择性的激动支气管平滑肌β<sub>2</sub>受体, 使平滑肌松弛, 支气管扩张的作用较强<sup>[1-4]</sup>。硫酸沙丁胺醇原料药在《美国药典》(USP40)、《欧洲药典》(EP9.0)<sup>[5]</sup>及《中国药典》2015年版<sup>[6]</sup>中均有收载, 硫酸沙丁胺醇有多种合成方法, 根据图1所示合成路线分析, 在第5到第6反应步骤中可能产生杂质有A、C、D、F、M、J, 在最后一步反应中有可能产生杂质O; 根据图2所以合成路线分析, 有可能在最后一步生成杂质C、E、F、G、O、J; 除以上2条路线外, 其他路线有可能产生B、K、L、Q、I

等杂质, 为快速准确的检测以上合成工艺中产生的杂质。本文参考EP9.0方法并对该方法优化, 建立检测14种杂质的有关物质方法并按相关指导原则进行了方法学验证<sup>[7]</sup>, 其中杂质G各国药典中均未收录, 本方法可对杂质G进行检测, 杂质G与其它杂质分离度达到要求, 由于在原料产品中未检出杂质G, 所以没有进行方法学考察; 根据原料中检出的杂质C、M并且结合EP9.0中的已知杂质C、D、F、O, 本文对杂质C、D、F、M、O进行方法学考察。14种杂质包括杂质A、B、C、D、E、F、G、K、M、O、L、Q、I、J(结构式见图3)。

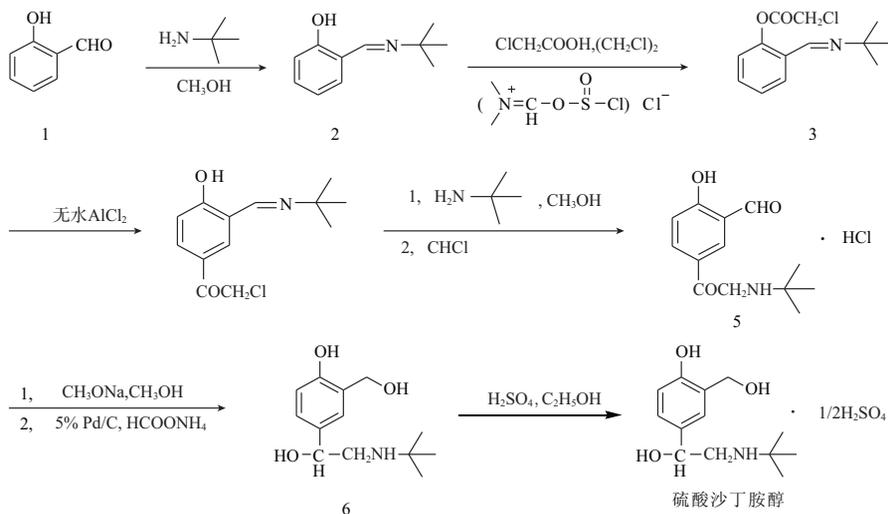


图1 硫酸沙丁胺醇合成路线1

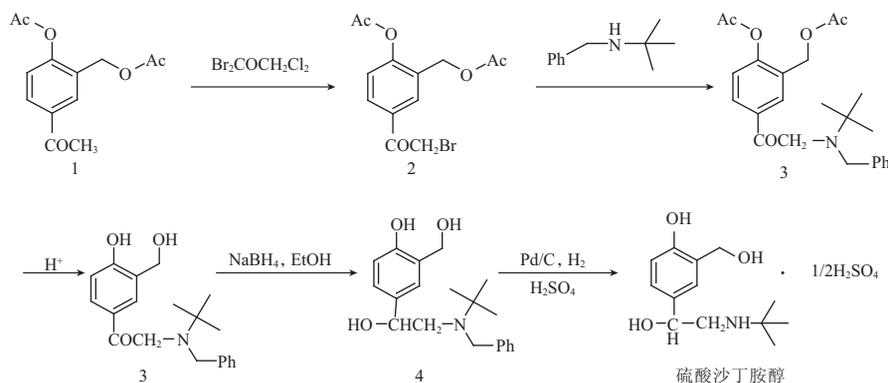
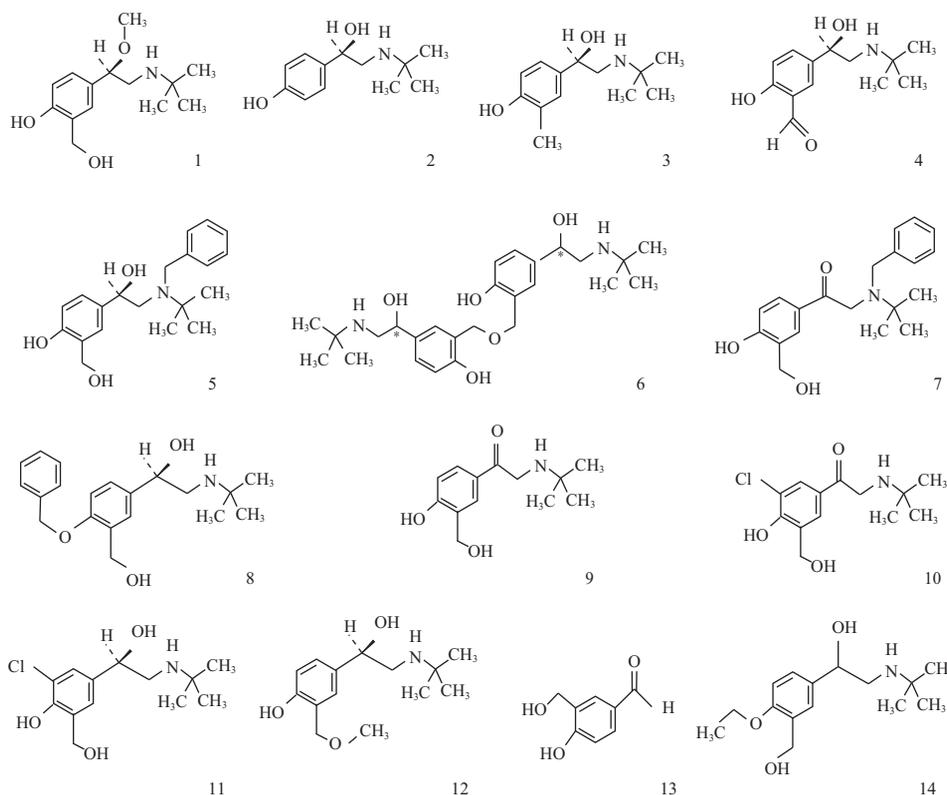


图2 硫酸沙丁胺醇合成路线2



注:1为杂质A;2为杂质B;3为杂质C;4为杂质D;5为杂质E;6为杂质F;7为杂质G;8为杂质I;9为杂质J;10为杂质K;11为杂质L;12为杂质M;13为杂质Q;14为杂质O

图3 硫酸沙丁胺醇合成过程中产生的杂质A、B、C、D、E、F、G、K、M、O、L、Q、I、J结构图

## 1 仪器与材料

LC-20A 日本岛津高效液相色谱仪; Mettler toledo 天平; pH 计美国 Eutech Instrument 公司。

硫酸沙丁胺醇原料药, 常州亚邦制药有限公司; 硫酸沙丁胺醇对照品 100 毫克/瓶, 批号 100328-200703 (纯度 99.3%), 国家药品标准物质中国食品药品检定研究院; 杂质 Salbutamol Impurity A 批号 1592-081A2、C 批号 1598-060A3、E 批号 2480-016A3、K 批号 1711-012A1、M 批号 1989-055A2、O 批号 1797-074A4、Q 批号 1816-031A2 (以上杂质采购于加拿大 TLC 公司)、B 批号 Y0000030、D 批号 Y0000071、F 批号 Y0000031、G 批号 Y0000034、I 批号 Y0000032、J 批号 Y0001186 (以上杂质采购于欧洲 EDQM)、L 批号 9E-11-3 (美国 CATO 公司)。庚烷磺酸钠, 磷酸二氢钾, 磷酸, 磷酸二氢钠, 三乙胺, 盐酸, 氢氧化钠, 30% 过氧化氢溶液 (国药), 甲醇, 乙腈 (Fisher)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱条件如下: 色谱柱: Hypersil Gold C<sub>8</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相: 流动相 A: 3.45 g 一水合磷酸二氢钠用 900 mL 0.05% 的三乙酸胺溶液溶解, 以稀磷酸调节 pH 至 3.0 之后用 0.05% 的三乙酸胺溶液定容至 1 000 mL。流动相 B: 甲醇: 乙腈 = 20: 80。按表 1 进行梯度洗脱; 检测波长: 273 nm, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 25 °C。

表 1 梯度洗脱程序表

时间	δ(A)/%	δ(B)/%
0~5 min	95	5
5~12 min	95→85	5→15
12~45 min	85→10	15→90
45~50 min	10→95	90→5
50~60 min	95	5

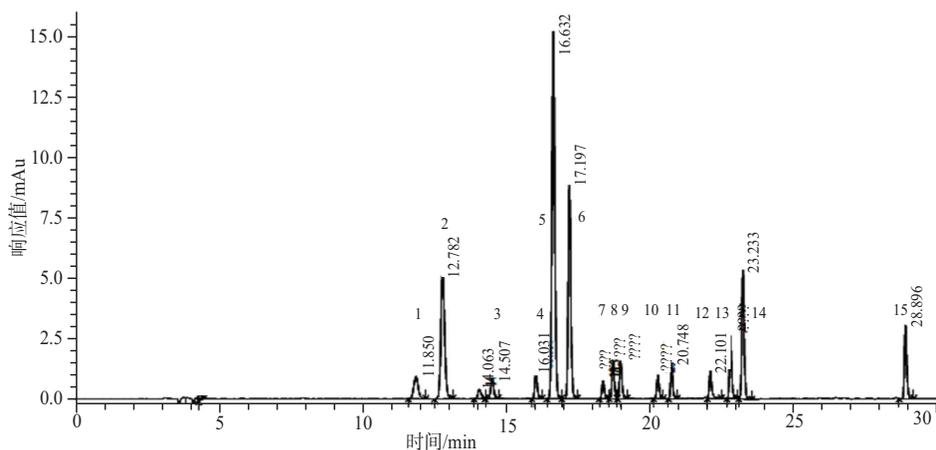
**2.2 系统适用性试验** 取杂质 A、B、C、D、E、F、G、K、M、O、L、Q、I、J 及硫酸沙丁胺醇对照品各适量, 精密称定。以流动相 A 溶解, 该混合溶液作为对照品溶液; 进样分析, 记录色谱图。各杂质之间分离度均符合要求, 其中杂质间最小分离度为 1.6。扣除空白的 HPLC 图谱见图 4。

## 2.3 溶液的制备

**2.3.1 供试品溶液的制备** 取硫酸沙丁胺醇原料药约 20 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用 2.1 项中流动相 A 溶解, 定容后摇匀, 配制成每 1 mL 中约含硫酸沙丁胺醇 0.4 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

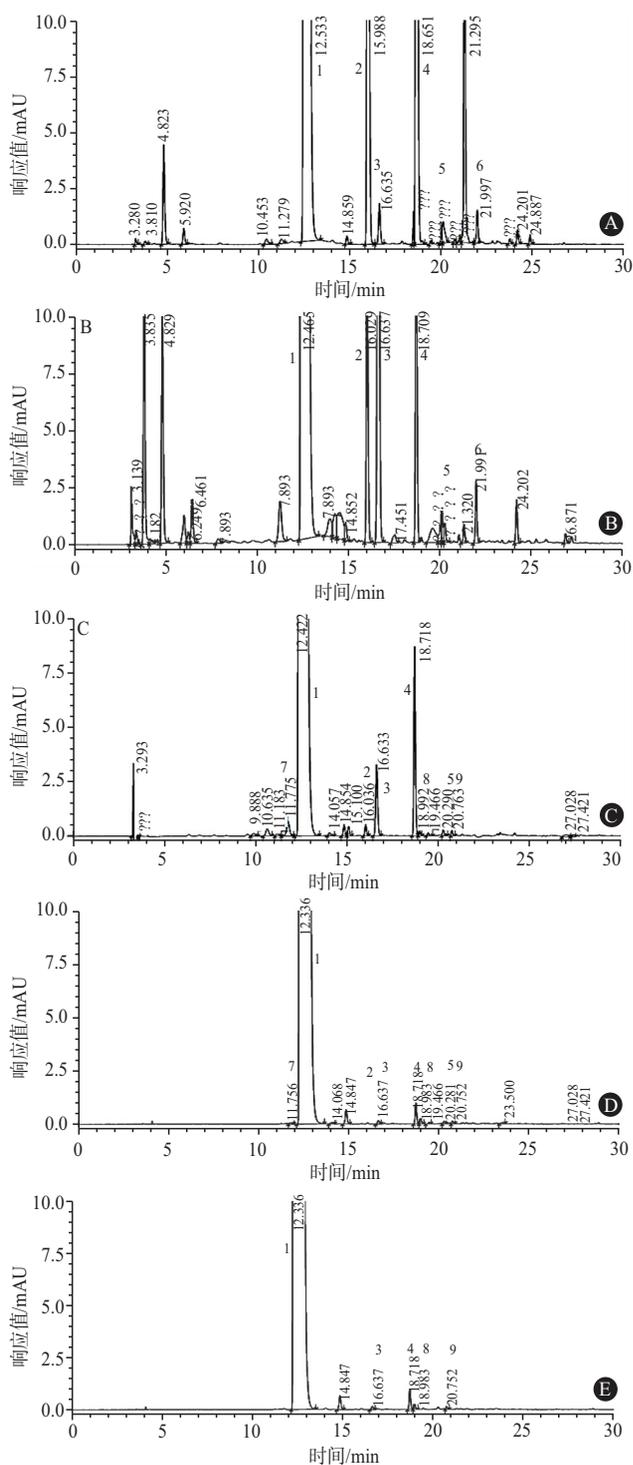
**2.3.2 杂质对照品溶液的制备** 分别取杂质 C、杂质 D、杂质 F、杂质 M、杂质 O 对照品各适量, 精密称定, 置于量瓶中, 用稀释液溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含杂质对照品 45 μg 的溶液, 作为对照品储备液。

**2.4 专属性试验<sup>[8]</sup>** 精密称取硫酸沙丁胺醇原料药 20 mg 4 份, 分置于 50 mL 量瓶中, 分别经过酸、碱、氧化、光照破坏后, 加入流动相 A 稀释至刻度, 作为破坏样品溶液。(1) 酸破坏: 样品中加入 3 mol/L HCL 溶液 6 mL, 85 °C 水浴加热 2 h 后, 加入 3 mol/L NaOH 溶液 6 mL 中和; (2) 碱破坏: 样品中加入 3 mol/L NaOH 溶液 3 mL, 85 °C 水浴中加热 2 h 后, 加入 3 mol/L HCL 溶液 3 mL 中和; (3) 氧化破坏: 样品中加入 300 g/L 过氧化氢溶液 1 mL, 85 °C 水浴中加热 2 h; (4) 光照破坏: 样品加入稀释液溶解并定容, 摇匀, 置 (4 500±500) lx 光照培养箱中照射 5 d; (5) 高温破坏: 取硫酸沙丁胺醇原料药 20 mg, 于 130 °C 烘箱中加热 1.5 h, 冷却, 用稀释液溶解并稀释至 50 mL; 取上述各破坏供试品溶液, 过滤后测定。扣除空白的 HPLC 图谱见图 5。图 5 可知, 本品经酸、碱、氧化、高温、光照破坏后, 各降解产物峰与硫酸沙丁胺醇峰均完全分离。



注: 1 为杂质 J; 2 为硫酸沙丁胺醇; 3 为杂质 B; 4 为杂质 A; 5 为杂质 K; 6 为杂质 Q; 7 为杂质 L; 8 为杂质 M; 9 为杂质 C; 10 为杂质 D; 11 为杂质 F; 12 为杂质 E; 13 为杂质 O; 14 为杂质 G; 15 为杂质 I

图 4 《欧洲药典》方法高效液相色谱图



注:1为硫酸沙丁胺醇;2为杂质A;3为杂质K;4为杂质M;5为杂质D;6为杂质E;7为杂质J;8为杂质C;9为杂质F

图5 专属性试验色谱图:A为酸破坏;B为碱破坏;C为氧化破坏;D为高温破坏;E为光照破坏;F为无破坏

**2.5 线性考察与定量限和检测限<sup>[9-10]</sup>的确定** 精密称取 105 °C 干燥 3.5 h 后的硫酸沙丁胺醇对照品约 45 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并定容, 取 1 mL 定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 作为硫酸沙丁胺醇对照储备液; 另精密称取杂质 C、D、F、M、O 对照品适量, 按“2.3.2”项方法制备各杂质的对照储备液。

精密量取硫酸沙丁胺醇及杂质 C、D、F、M、O 对照品储备液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以流动相 A 稀释后定容, 摇匀, 检测后记录峰面积。以质量浓度 ( $\rho$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标分别绘制标准曲线。取硫酸沙丁胺醇及各杂质对照储备液, 逐级稀释后检测, 以信噪比 (10:1) 时的质量浓度为定量限、信噪比 (3:1) 时的质量浓度为检测限, 结果见表 2, 线性关系良好, 定量限及检测限能够满足各特定杂质检测的要求。

**2.6 精密度试验** 精密量取“2.5”项的硫酸沙丁胺醇对照品储备液 0.1、0.5 和 1.0 mL, 分置于 10 mL 量瓶中, 加稀释液稀释至刻度, 摇匀, 制成低 (0.45  $\mu\text{g/mL}$ )、中 (2.25  $\mu\text{g/mL}$ )、高 (4.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 3 个质量浓度的供试品溶液, 每个质量浓度各配制 3 份。分别进样, 记录色谱图, 计算低、中、高 3 个质量浓度的相对标准偏差 (RSD), 结果分别为 3.6%、2.9% 和 2.2%, 表明本法重复性良好。

精密量取“2.5”项的杂质 C、D、F、M、O 对照品储备液方法同上, 其相对标准偏差 (RSD) 分别为: 0.7%~2.6% (杂质 C); 0.8%~3.1% (杂质 D); 0.7%~3.5% (杂质 F); 0.8%~1.9% (杂质 M); 0.9%~3.5% (杂质 O), 表明本法对杂质 C、D、F、M、O 检测的重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取硫酸沙丁胺醇原料药 20.01 mg, 按“2.3.1”项方法制备供试溶液, 分别放置 0、1、2、4、6、8、10 和 12 h 进样, 按外标法计算。平均总杂质为 0.65%, RSD 为 1.6% ( $n=8$ ), 在 12 h 内各有关物质含量无明显变化。结果表明: 供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.8 回收率试验<sup>[11-13]</sup>** 取硫酸沙丁胺醇原料药约 45 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 作为样品, 共 9 份, 精密加入杂质 C、D、F、M、O 的对照品储备液 0.1、0.5 和 1.0 mL 各 3 份, 定容后摇匀, 配制成低 (0.45  $\mu\text{g/mL}$ )、中 (2.25  $\mu\text{g/mL}$ )、高 (4.5

表 2 线性关系及定量限与检测限结果

样品	线性方程	$r(n=6)$	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$	LOQ/ $(\mu\text{g/mL})$	LOD/ $(\mu\text{g/mL})$
硫酸沙丁胺醇	$A = 7\ 302.01\rho - 208.45$	0.999 7	0.45~18.0	0.27	0.08
杂质 C	$A = 9\ 260.5\rho + 265.57$	0.999 6	0.45~18.1	0.07	0.02
杂质 D	$A = 6\ 199.3\rho + 140.97$	0.999 8	0.44~18.2	0.10	0.03
杂质 F	$A = 7\ 600.4\rho - 451.04$	0.999 6	0.46~18.0	0.08	0.02
杂质 M	$A = 9\ 126.9\rho - 78.172$	0.999 9	0.42~18.3	0.07	0.02
杂质 O	$A = 6\ 845.5\rho + 585.51$	0.999 7	0.44~18.1	0.09	0.03

μg/mL) 3个浓度的供试品溶液。另精密量取杂质C、D、F、M、O对照品储备液各0.5 mL,置于同一个10 mL量瓶中,定容后摇匀,作为对照溶液。另取硫酸沙丁胺醇原料药45 mg,置1 000 mL量瓶中,定容后摇匀,作为本底校正溶液。分别进样测定,按外标法以峰面积计算杂质C、D、F、M、O含量,扣除本底量后计算回收率。杂质C、D、F、M、O回收率分别为99.1%、99.3%、100.1%、100.5%、100.2%,RSD%分别为2.6%、2.1%、2.5%、1.7%、1.9%(n=9)。

**2.9 样品测定**<sup>[14]</sup> 取硫酸沙丁胺醇原料药与各有关物质对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液、对照品溶液储备液并进行稀释,分别进样,记录色谱图。供试溶液的色谱图中如出现与对照溶液中相应已知杂质保留时间一致的色谱峰,按外标法计算各有关物质含量,结果见表3。

表3 样品中硫酸沙丁胺醇有关物质检测结果/%

批号	杂质C	杂质D	杂质M	杂质F	杂质O	未知的单一杂质	杂质总量
20180301	0.072	—	0.112	—	—	0.036	0.592
20180302	0.061	—	0.103	—	—	0.041	0.577
20180303	0.068	—	0.097	—	—	0.046	0.491

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 采用二极管阵列检测器对硫酸沙丁胺醇及各杂质进行全波长扫描,在本文色谱条件下,由混合对照品溶液PDA图谱结果可知,杂质I在262 nm附近有较强吸收,范围较宽,杂质D在255 nm处有较强吸收,范围较宽,硫酸沙丁胺醇及其他杂质在273 nm左右处有特征吸收峰;综合考虑,确定273 nm作为硫酸沙丁胺醇有关物质的检测波长。

**3.2 色谱条件的优化** 根据图2可知,其中杂质L、M、C之间分离度较小,根据图1中杂质的结构式可知,以上三种杂质结构较为相似,其中杂质L极性最大,杂质C极性最小,在梯度选择时,5~12 min梯度变化10%,为了保证杂质J与主成分峰分离,在12~45 min梯度变化75%,通过较大的极性变化使较难分离的杂质L、M、C达到分离要求,其中L、M、C的出峰顺序符合从极性从大到小的梯度变化。

**3.3 杂质分析** 本实验所使用的原料药外购原料药,由于不了解其具体的合成工艺,无法推断图3的F中保留时间为14.847 min的杂质结构。杂质G为中间体反应过程中还原不完全的副产物,在进行下一步反应时可产生新的杂质,有必要对杂质G进行控制,本方法可检测该杂质,提高反应过程中的质量控制。

**3.4 检测方法分析** 药品不良反应往往与其中杂质相关,杂质研究及控制是药品安全保证的关键要

素,在药品研发中具有重要地位。随着药品研究的深入和发展,杂质研究理念已经由杂质控制飞跃至杂质谱控制,杂质谱分析引入到工艺路线的风险评估中,本方法针对硫酸沙丁胺醇工艺路线中可能产生的大部分杂质进行检测,达到多个杂质同时检测的目的,提高效率;与原有检测方法比较,该方法可同时检测杂质数量更多,适用于多种合成方法的杂质研究,更加符合杂质谱分析的理念,对杂质深入研究,建立针对性的分析方法,提高药品质量。

**3.5 小结** 强制降解试验结果表明,硫酸沙丁胺醇原料药在高温、光照条件下较稳定,在强酸碱及氧化条件下发生降解。由使用本方法检测的结果可知,破坏产生的各杂质于硫酸沙丁胺醇均能达到较好分离,方法专属性强,灵敏度高,利于硫酸沙丁胺醇有关物质检测。更好控制原料药的质量,也为制剂的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 羊礼荣,顾倩,杨晓光,等.硫酸镁联合硫酸沙丁胺醇雾化吸入治疗小儿重度支气管哮喘急性发作的临床观察[J].中国药房,2016,27(23):3252-3254.
- [2] 张子友,杨先文,吉张燕,等.不同剂量沙丁胺醇雾化吸入辅助治疗小儿支气管哮喘急性发作的效果及对肺功能的影响[J].中外医学研究,2018,16(4):33-34.
- [3] 王玉玲.硫酸沙丁胺醇气雾剂治疗哮喘患者的临床分析[J].黑龙江医药,2017,30(3):563-564.
- [4] 赵辉,杨国峰.综合护理措施在硫酸沙丁胺醇气雾剂吸入治疗慢性阻塞性肺疾病中的作用[J].中国医科大学学报,2017,46(2):184-187.
- [5] THE EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. European Pharmacopoeia 9.0 [S]. European: European Directorate for the Quality Control of Medicines, 2016: 3526-3528.
- [6] 国家药典委员会.中国药典(二部)[S].北京:化学工业出版社,2015:1330-1331.
- [7] 贾首时,王萌萌,王超众.HPLC法测定索非布韦片的有关物质[J].中国药品标准,2018,19(1):38-43.
- [8] 沈瑶琳,冯爱娟,郭啸,等.HPLC法测定维格列汀原料药中的有关物质[J].药物分析杂志,2016,36(7):1252-1257.
- [9] 陈勇.浅谈检测限[J].中国现代药物应用,2013,7(16):256-257.
- [10] 谢沐风,罗霞萍,陈亚美.如何建立HPLC法测定有关物质的方法[J].中国药品标准,2002,3(6):6-8.
- [11] 湛雯,景霞,孙芳,等.HPLC法同时测定小儿复方呋喃西林滴鼻液中的盐酸麻黄碱与呋喃西林含量[J].安徽医药,2016,20(1):50-53.
- [12] 查道仁.HPLC法测定二十五味阿魏胶囊中非法添加卡托普利、氯氮、盐酸异丙嗪、硝苯地平的含量[J].安徽医药,2014,18(9):1653-1655.
- [13] 岳莉,戚继红,沈伟.HPLC法测定清热暗疮丸中绿原酸的含量[J].安徽医药,2015,19(3):463-465.
- [14] 李传响,汪玉萍.HPLC法测定注射用阿奇霉素的含量[J].安徽医药,2015,19(5):1082-1083.

(收稿日期:2018-07-26,修回日期:2018-10-15)