

硫酸沙丁胺醇注射液有关物质液相检测方法研究

高兆菊*

(上海信谊金朱药业有限公司, 上海 201506)

摘要: 目的 对硫酸沙丁胺醇注射液建立一个专属性强的有关物质检测方法。**方法** 高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 用辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (Hypersil BDS C8 4.6×150 mm, 3 μm), 流动相 A: 3.45 g/L 磷酸二氢钠二水合物溶液 (用磷酸调节 pH 至 3.0±0.02); 流动相 B: 甲醇:乙腈=10:90, 进行梯度洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 柱温为 25°C, 检测波长为 220 nm, 进样体积 50 μL。**结果** 主成分及 15 个杂质专属性良好, 对其中 6 个杂质进行方法验证, 其线性关系、重复性、回收率良好。**结论** 主成分可与 15 个杂质完全分离, 方法专属性强, 操作简便, 可用于硫酸沙丁胺醇注射液有关物质的检测。

关键词: 硫酸沙丁胺醇; 注射剂; 有关物质检测方法; 高效液相色谱法

Study on the liquid phase detection method of related substances in salbutamol sulfate injection

GAO Zhao-Ju*

(Shanghai Sine-Jin Zhu Pharmaceutical Corp., Ltd., Shanghai 201506, China)

ABSTRACT: Objective To establish a highly specific method for the determination of related substances in salbutamol sulfate injection. **Methods** HPLC was performed on a column packed with spherical end-capped octylsilyl silica gel (Hypersil BDS C8 4.6×150 mm, 3 μm) at the flow rate of 0.6 mL/min, the detection wavelength of 220 nm and column temperature of 25°C by gradient elution using 3.45 g/L sodium dihydrogen phosphate dihydrate solution (adjust to pH 3.0 with phosphoric acid) as mobile phase A, 10 volumes of methanol and 90 volumes of acetonitrile as mobile phase B. **Results** The chromatograph showed good specificity of the peaks of main components and 15 impurities, and the method verification of 6 of the impurities showed good linear, repeatability and recovery. **Conclusion** The chromatographic peaks of the main components in salbutamol can be completely separated from the 15 impurities. The established method is highly specific, easy to operate and can be used for the inspection of related substances in salbutamol sulfate injection.

KEY WORDS: salbutamol sulfate; injection; methods for the detection of substances; HPLC

0 引言

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病。近年来, 哮喘的发病率

和死亡率在全球范围内持续增加, 哮喘已成为仅次于癌症的世界第二大致死和致残疾病。哮喘病的治疗日益受到重视, 平喘类药物已经成为现代药物研究的重点, 硫酸沙丁胺醇以其良好的

* 通信作者: 高兆菊, 硕士, 工程师, 执业药师, 高级技师, 研究方向为药品研发。E-mail: 287743593@qq.com

*Corresponding author: GAO Zhao-Ju, Master, Engineer, Licensed Pharmacist, Senior Technician, Shanghai Sine-Jin Zhu Pharmaceutical Corp., Ltd., Shanghai 201506, China. E-mail: 287743593@qq.com

药效,成为治疗哮喘和慢性阻塞性肺疾病(COPD)的首选药物^[1-3]。

沙丁胺醇是由英国葛兰素公司研发并于1968年首次上市^[4],属于强效速效的肾上腺 β_2 受体激动剂,具有选择性,作用于支气管平滑肌上 β_2 受体,产生较快的支气管扩张作用,其硫酸盐形式的制剂临床上用于治疗支气管哮喘或喘息型支气管炎等伴有支气管痉挛的呼吸道疾病^[5]。

硫酸沙丁胺醇有多种合成方法,不同的合成路线可能产生不同的杂质。原料生产过程中带入的起始原料、中间体、聚合物、副反应产物以及制剂在贮藏过程中的降解产物,这些都可能是杂质的来源^[6-8]。杂质是药品质量研究中的关键性项目之一,它不仅是反映其纯度的直接指标,而且有重要的安全意义,表现在杂质可能降低药效和稳定性,增加过敏反应和毒性等。硫酸沙丁胺醇注射液收载于2020版《中国药典》,但未控制有关物质,无法显示出杂质的含量,确保药品的安全性和有效性^[9]。《中国药典》《欧洲药典》的原料药以及《英国药典》的注射液将杂质J与其他杂质分为两个不同的检测方法,操作较为繁琐;如《中国药典》将原料的杂质J采用紫外-可见分光光度法检测,其方法的检测灵敏度较低,其他有关物质为液相色谱法,但是只控制最大单杂和总杂,国内有企业对原料杂质的检测方法进行了研究;《英国药典》将制剂的杂质J单独采一个液相色谱法,流动相、色谱柱等色谱条件与其他有关物质方法不相同,不能一次完成杂质的检测,因此有必要建立一个专属性强的杂质检测方法^[8-11]。本研究建立了硫酸沙丁胺醇注射液有关物质的检测方法,考察了《欧洲药典》中所有的15个已知杂质的专属性^[12],主成分和各杂质之间达到了基线分离,同时对其中6个杂质进行了系统适用性、线性、重复性、准确度等的验证,采用加校正因子的自身对照法进行定量。

1 材料与方法

1.1 材料

高效液相色谱仪(赛默飞)。色谱柱为BDS Hypersil C8 4.6×150 mm, 3 μ m(赛默飞)。

硫酸沙丁胺醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号100328-201804);杂质F对照品(惠州国建生物科技,批号5012-162A1);杂质H对照品(深圳海斯安生物技术,批号202003);杂质除F、H外其他均来自广州牌牌,采用内部编码,包括杂质A、B、C、D、E、G、I、J、K、L、M、N和O。

硫酸沙丁胺醇注射液(上海信谊金朱药业有限公司,批号2011101-4)。研究中所用水均为纯化水,甲醇和乙腈均为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 分析方法以及杂质限度制定

《中国药典》原料药对杂质进行控制,杂质J采用紫外方法,有关物质采用自身对照方法,只控制最大单杂和总杂;《英国药

典》制剂控制了有关物质,杂质J采用外标法,其他非特定杂质采用自身对照法;本研究采用自身对照法,可以有效分离已知的15个杂质,其中6个特定杂加校正因子。

根据制剂的用法用量,每日最大剂量为沙丁胺醇2.8 mg;根据ICH指导原则^[13],得出报告限度为0.1%,鉴定限度为0.5%,界定限度为1.0%;与BP的限度一致。本研究制定的杂质限度与BP注射液的标准保持一致。

1.3 色谱条件

流动相A为3.45 g/L磷酸二氢钠二水合物溶液(用磷酸调节pH至3.0);流动相B为甲醇:乙腈=10:90,稀释用初始流动相为98%流动相A于2%流动相B混匀;按表1进行线性梯度洗脱;检测波长为220 nm,柱温为25°C,流速为0.6 mL/min,进样量为50 μ L。

表1 色谱洗脱条件

Table 1 Chromatographic elution condition

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	98	2
5	98	2
12	97	3
25	94	6
45	90	10
65	55	45
75	55	45
76	98	2
85	98	2

1.4 溶液配制

(1) 供试品及自身对照溶液

移取2 mL硫酸沙丁胺醇注射液于5 mL量瓶中,然后用稀释用初始流动相稀释并定容到刻度,摇匀即得。

移取供试品溶液0.5 mL于100 mL量瓶中,然后用稀释用初始流动相稀释并定容至刻度,摇匀即得。

(2) 对照品贮备溶液

精密称取硫酸沙丁胺醇对照品适量,加初始流动相溶解,摇匀,制得约含硫酸沙丁胺醇为1 mg/mL的对照品贮备溶液;精密称取各杂质适量,加初始流动相溶解,摇匀,制得约含1 mg/mL的杂质对照品贮备溶液。

(3) 系统适用性及专属性溶液

称取硫酸沙丁胺醇对照品、杂质B、杂质J适量,用初始流动相稀释作为系统适用性溶液(硫酸沙丁胺醇约96 μ g/mL、杂质B约0.48 μ g/mL、杂质J约0.48 μ g/mL)。

取硫酸沙丁胺醇对照品贮备液及各杂质贮备液适量于同一量瓶中,用初始流动相稀释成含硫酸沙丁胺醇约96 μ g/mL和各杂质约0.48 μ g/mL的溶液。

(4) 线性溶液

分别取上述硫酸沙丁胺醇对照品、杂质J、杂质B、杂质A、

杂质 C、杂质 D 和杂质 F 贮备液适量于同一量瓶中，用初始流动相稀释成分别相当于供试品浓度的 0.08%、0.25%、0.50%、1.00%、1.50% 和 2.00% 的溶液，作为线性溶液。

(5) 检测限及定量限溶液

取线性溶液中 L1 线性溶液 7.5 mL 至 10 mL 容量瓶中，加初始流动相稀释至刻度，摇匀，即得测试溶液；取测试溶液 5 mL 至 10 mL 容量瓶中，加初始流动相稀释至刻度，摇匀，平行配制 3 份，即得检测限溶液。取线性溶液中 L1 线性溶液 10 mL 至 10 mL 容量瓶中，加初始流动相稀释至刻度，摇匀，平行配制 6 份，即得定量限溶液。

(6) 精密溶液

移取 2 mL 硫酸沙丁胺醇注射液于 5 mL 量瓶中，再精密移取上述杂质 J、B、A、C、D 和 F 贮备液适量，加初始流动相溶解并稀释定容至刻度，摇匀，制得约含杂质 D 0.96 $\mu\text{g/mL}$ 和其他各杂质 0.48 $\mu\text{g/mL}$ 的加标供试品溶液，平行配制共 6 份作为重复性溶液。由另一分析人员按重复性方法重新配制 6 份供试品溶液，即得中间精密溶液。

(7) 准确度溶液

移取 2 mL 硫酸沙丁胺醇注射液于 5 mL 量瓶中，再精密移取上述杂质 J、B、A、C、D 和 F 贮备液，加初始流动相溶解

并稀释定容至刻度，摇匀，分别制得各杂质约相当于限度浓度的 50%、100%、150% 的加标供试品溶液。每个浓度项下平行配制 3 份作为准确度溶液。

2 结果与分析

2.1 系统适用性

系统适用性溶液硫酸沙丁胺醇与前后峰分离度分别为 2.31 (杂质 J) 和 4.91 (杂质 B)，大于 1.5 (图 1)。

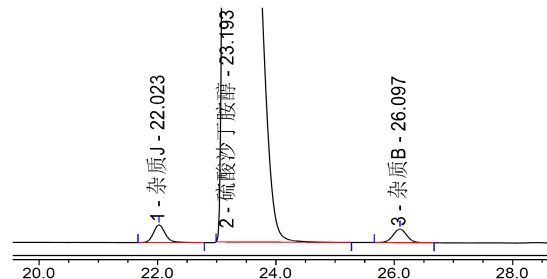


图 1 系统适用性溶液色谱图

Fig.1 System suitability solution chromatogram

2.2 专属性

主成分及 15 个杂质之间分离效果良好，分离度均大于 1.5，表明该方法专属性强 (图 2)。

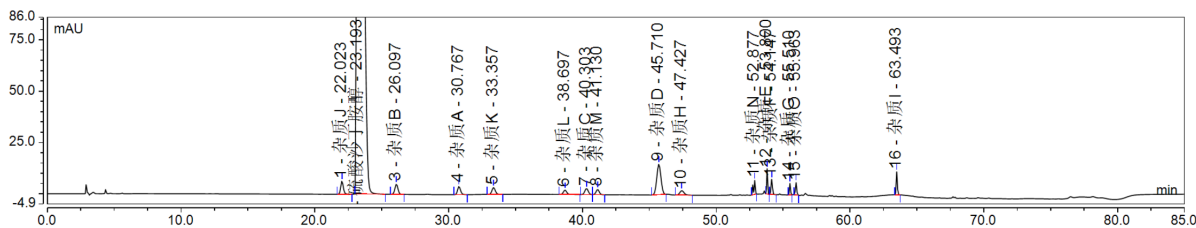


图 2 专属性溶液色谱图

Fig.2 Specific solution chromatogram

2.3 线性及校正因子

对杂质 J、B、A、C、D 和 F 和硫酸沙丁胺醇对照品进行线性关系研究，横坐标为浓度 C ($\mu\text{g/mL}$)，纵坐标为峰面积 A ($\text{mAu} \times \text{min}$)，进行线性回归；在研究时，考虑仪器的差异，采用不同仪器重复一次试验，由研究结果可知，各杂质对照品在不同浓度范围内显示出与峰面积具有较好的线性关系。

根据线性曲线，计算 6 个杂质相对于沙丁胺醇的校正因子，结果显示：6 个特定杂质的校正因子均在 0.2~5.0 的范围内，可以采用加校正因子的主成分自身对照法进行检查，其中杂质 C 和 F 校正因子在 0.9~1.1 范围内，可不予校正，杂质 A、B、D 和 J 校正因子超出 0.9~1.1 的范围，需进行校正。

2.4 定量限与检测限

以研究的 6 个杂质 $S/N \geq 10$ 计算最低定量限，以研究的 6 个杂质 $S/N \geq 3$ 计算最低检测限，其中沙丁胺醇检测限浓度为 0.0199 $\mu\text{g/mL}$ ，最小 S/N 为 4.10，定量限浓度为 0.0532 $\mu\text{g/mL}$ ，

最小 S/N 为 10.60，结果均符合要求。

2.5 精密性

以加校正因子的自身对照法计算 6 份重复性溶液中各杂质的含量，杂质 J 的含量 RSD 值为 1.13%，杂质 B 的含量 RSD 值为 5.34%，杂质 A 的含量 RSD 值为 2.73%，杂质 C 的含量 RSD 值为 0.00%，杂质 D 的含量 RSD 值为 0.76%，杂质 F 的含量 RSD 值为 0.88%，符合规定；RSD 均在 8% 以内，说明该检查方法重复性良好。

中间精密性 ($n=12$)，杂质 J 含量的 RSD 值为 2.34%，杂质 B 含量的 RSD 值为 4.01%，杂质 A 含量的 RSD 值为 3.63%，杂质 C 含量的 RSD 值为 3.15%，杂质 D 含量的 RSD 值为 0.85%，杂质 F 含量的 RSD 值为 0.88%，结果均符合规定。

2.6 准确度

以外标法分别计算各杂质 3 个不同加标浓度的重复性溶液平均回收率，结果均在 90%~108% 之间， $RSD \leq 8\%$ ，准确度良好。

2.7 溶液稳定性

硫酸沙丁胺醇注射液供试品溶液和其自身对照溶液常温放置 25.6 h, 测定并计算 6 个的杂质峰面积的 RSD 值, 在 0.39%~3.32% 范围内, 均不超过 5%, 结果符合要求, 说明制剂供试品溶液和自身对照溶液常温放置 25.6 h 较稳定。对照品溶液常温放置 25.6 h 测定, 主成分和 6 个杂质峰面积的 RSD 值, 在 1.40%~2.26% 范围内, 均不超过 5%, 结果符合要求, 说明对照品溶液常温放置 25.6 h 稳定。

3 讨论与结论

本研究建立了硫酸沙丁胺醇注射液杂质的检测方法, 采用高效液相色谱法, 主成分和 15 个已知杂质之间达到了基线分离, 分离度均大于 1.5。本研究还对其中 6 个杂质进行了方法学验证, 均符合《中国药典》9101 分析方法验证指导原则中的标准。相比国内外药典对杂质 J 和其他杂质分为两种不同的方法, 本方法是一种专属性强的方法, 能够保证有关物质有效分离; 相比外标法, 本研究采用加校正因子的自身对照法, 更为简便高效, 可用于控制硫酸沙丁胺醇注射液可能产生各种杂质, 满足了药品生产企业对杂质检测一致性评价的要求, 保障了硫酸沙丁胺醇注射液的安全性及其质量的可控性, 探讨了硫酸沙丁胺醇注射液杂质限度的确定原则与方法。仿制药一致性评价中有关物质的研究具有重要的理论和实践意义, 本研究可以对类似的研究起到一定的参考和帮助, 为提高仿制药的质量和安全性做出更大的贡献^[12,14-15]。

参考文献

- [1] 孙好. 硫酸沙丁胺醇联合布地奈德混悬液雾化吸入治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的效果 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(32): 43-45.
- [2] 李雪. 硫酸沙丁胺醇雾化治疗小儿喘息性疾病的疗效和安全性评价 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019, 6(07): 131,137.
- [3] 李盈利, 彭丽, 吕东青. 硫酸沙丁胺醇雾化吸入联合孟鲁司特治疗急性发作期哮喘患儿的疗效及对免疫功能的影响 [J]. 临床合理用药, 2023, 16(31): 117-120.

- [4] LANDAU R, ACHILLADELIS B, SCRIBINE A. Pharmaceutical innovation: revolutionizing human health [M]. Philadelphia: Chemical Heritage Foundation, 1999.
- [5] Salbutamol [EB/OL]. [2023-04-04]. <https://www.drugs.com/salbutamol.html> [2024-04-04].
- [6] 郑玉梅. 硫酸沙丁胺醇的合成研究 [D]. 上海: 东华大学, 2006.
- [7] 薛允宁, 胡小燕, 韩洋. 硫酸沙丁胺醇的生产工艺研究 [J]. 辽宁化工, 2022, 51(05): 596-598.
- [8] 王鑫, 刘宏大, 薛雁, 等. 高效液相色谱法测定硫酸沙丁胺醇有关物质的含量 [J]. 安徽医药, 2020, 24(02): 242-246.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版 (二部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1587, 1583-1584.
- [10] Council of Europe. EP11.0 [M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2022: 3933-3938.
- [11] Great Britain. Medicines Commission, General Medical Council (Great Britain). British pharmacopoeia [M]. London: General Medical Council, 2024.
- [12] 国务院办公厅关于开展仿制药质量和疗效一致性评价的意见 [J]. 中国药物评价, 2016, 33(02): 68-69.
- [13] ICH Q3B(R2): 新药制剂中的杂质 [EB/OL]. [2006-06-02]. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/downloadAtt/2/60d91f5ba30dfbb56663ffacfa67718d> [2024-04-02].
- [14] 周立春. 仿制药一致性评价中有关物质研究的思考 [J]. 药学进展, 2016, 40(12): 924-927.
- [15] 李颖仪. 仿制药一致性评价中有关物质研究的思考 [J]. 心血管外科杂志 (电子版), 2018, 7(04): 833.

作者简介



高兆菊, 硕士, 工程师, 执业药师, 高级技师, 研究方向为药品研发。