HPLC 法测定盐酸妥洛特罗中的有关物质

于彩霞[1,2]，杨丽娜[2]，夏林涛[2]，张福利[2]，林丽娅[2*]
（1. 上海工程技术大学化学化工学院，上海 201620；2. 上海医药工业研究院有限公司，上海 201203）

摘要：建立了 HPLC 法测定盐酸妥洛特罗（**1**）中的有关物质，即邻氯苯乙酮（**2**）、α- 溴代邻氯苯乙酮（**3**）、2,2- 溴代邻氯苯乙酮（**4**）、1-（2- 氯苯基）乙醇（**5**）、2- 氯苯基环氧乙烷（**6**）、1-（2- 氯苯基）-1,2- 乙二醇（**7**）、2,2- 溴代邻氯苯乙醇（**8**）和 1- 叔丁胺基 -1-（2- 氯苯基）乙醇盐酸盐（**9**）。色谱柱采用 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以辛烷磺酸钠缓冲液：乙腈（90 ∶ 10）为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱。流速为 1.0 ml/min，检测波长为 215 nm，柱温为 30 ℃。结果显示，**1** 和杂质 **2** ～ **9** 均分离良好，且在各自浓度范围内线性关系良好；**2** ～ **9** 的平均回收率（n=12）为 100.3%～ 106.6%，RSD 为 2.6%～ 8.7%。**1**、**2**、**3**、**5**、**6**、**7**、**9** 的检测限为 0.05 μg/ml，**4** 和 **8** 的检测限为 0.15 μg/ml。建立的方法准确性好、灵敏度高，可用于 **1** 中有关物质的测定。

关键词：盐酸妥洛特罗；高效液相色谱；有关物质
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）08-1186-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.014

Determination of the Related Substances in Tulobuterol Hydrochloride by HPLC

YU Caixia[1,2], YANG Lina[2], XIA Lintao[2], ZHANG Fuli[2], LIN Liya[2*]
（*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering and Science, Shanghai 201620; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203*）

ABSTRACT: An HPLC method was established for the determination of related substances, namely 2'-chloroacetophenone（**2**）, 2-bromo-2'-chloroacetophenone（**3**）, 2,2-bromo-2'-chloroacetophenone（**4**）, 1-（2-chlorophenyl）ethanol（**5**）, 2-chlorophenyl ethylene oxide（**6**）, 1-（2-chlorophenyl）-1,2-glycol（**7**）, 2,2-bromo-2'-chlorophenethyl alcohol（**8**）and 1-*tert*-butylamino-1-（2-chlorophenyl）ethanol hydrochloride（**9**）, in tulobuterol hydrochloride（**1**）. The Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} column（4.6 mm×250 mm, 5 μm）was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode, with sodium octane sulfonate buffer ∶ acetonitrile（90 ∶ 10）as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B. The flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 215 nm, and the column temperature was 30 ℃. The results showed that the peaks of **1** and impurities **2** – **9** were well separated, and it was linear for **1** – **9** in the corresponding concentration ranges. The average recoveries（n=12）of **2** – **9** were 100.3% – 106.6%, with the RSDs of 2.6% – 8.7%. The detection limit was 0.05 μg/ml for **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7** and **9**, and 0.15 μg/ml for **4** and **8**. The established method has good accuracy and high sensitivity, which can be used for the determination of related substances in **1**.

Key Words: tulobuterol hydrochloride; HPLC; related substance

盐酸妥洛特罗（tulobuterol hydrochloride，**1**）是一种白色结晶性粉末，为选择性 β_2 受体激动药，对支气管平滑肌有较强而持久的扩张作用，常用于缓解支气管哮喘、急慢性支气管炎、肺气肿等气道阻塞性肺疾病所致的呼吸困难[1]。

收稿日期：2022-02-23
作者简介：于彩霞（1995—），女，硕士研究生，专业方向：药物质量研究。
通信作者：林丽娅（1983—），女，硕士，从事药物质量研究与开发。
E-mail：lly3008@163.com

本课题组前期对 **1** 的合成工艺进行了优化，采用“一锅法”工艺，更适用于工业化生产[2]。**1** 的合成路线及杂质来源见图 1。通过分析合成路线，**1** 可能存在的有关物质包括原料引入：因合成工艺为“一锅法”，故起始物料邻氯苯乙酮（**2**）可能在 **1** 中存在；工艺杂质：α- 溴代邻氯苯乙酮（**3**）和 2- 氯苯基环氧乙烷（**6**）均为合成过程中产生的中间体，**6** 经水解得到 1-（2- 氯苯基）-1,2- 乙二醇（**7**），**6** 与叔丁胺反应可能产生副产物 1- 叔丁胺基 -1-（2- 氯苯基）乙醇盐酸盐（**9**）；2,2- 溴代邻氯苯乙酮（**4**）是 **2** 经溴代产生的副产物，2,2- 溴代邻氯苯乙醇（**8**）是 **4** 经硼氢化钠还原得到的副产物；1-（2- 氯苯基）- 乙醇（**5**）是 **2** 经硼氢化钠还原得到的副产物。因此，杂质 **2** ～ **9** 可能存在于 **1** 中，为确保 **1** 的质量及安全性，须建立相应的控制方法，对 **1** 在生产和贮存等环节产生的有关物质进行监控。

目前 **1** 仅被日本药典（JP 18）和韩国药典（KP X）收录，但关于其杂质目前尚未见报道。鉴于现有药典（JP 18 和 KP X）对 **1** 的杂质谱尚未研究，且本实验室在对药典方法进行重现时，发现 **1** 与其杂质峰无法分离，故在已有药典方法上进行改进，建立了 HPLC 法同时测定 **1** 中 8 个有关物质（杂质 **2** ～ **9**），通过加校正因子的主成分自身对照法计算各已知杂质的含量，并进行了方法学验证，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

U3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；CP9225D 型分析天平和 PB-10 型 pH 计均购于德国 Sartorius 公司；XPR 10 型分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；DZF-6020 型真空干燥箱和 LHH-250SD 型药

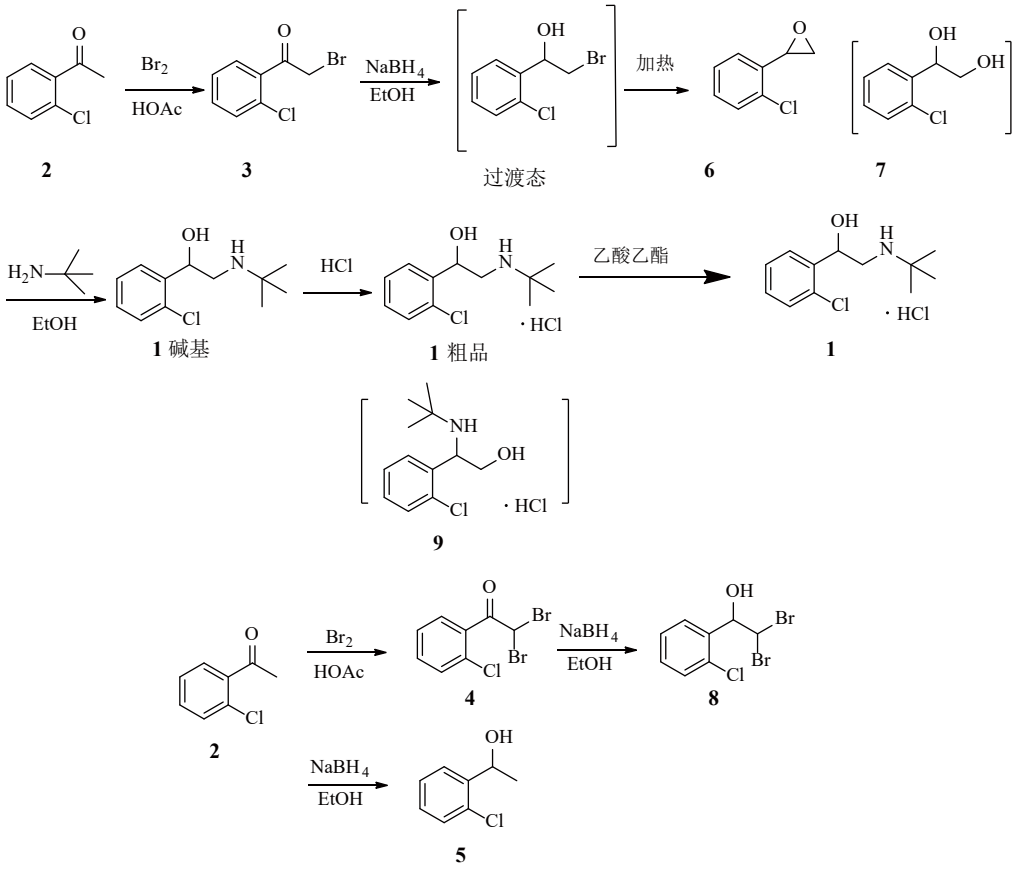


图 1 1 的合成路线及杂质来源

Fig.1 Synthetic Route of **1** and Sources of Impurities

品稳定性试验箱均购于上海一恒科学仪器有限公司。

1 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 99.4%，批号 100472-202002）；**1** 原料药（批号 20210702、20210706、20210720）以及 **4**（含量 91.23 %，批号 20210308）、**6**（含量 98.28 %，批号 20210615）、**8**（含量 91.99 %，批号 20210617）、**9**（含量 99.71 %，批号 20210620）的对照品均为自制，合成方法见文献[2]；**2**（含量 97.99 %，批号 R20080192）和 **5**（含量 98.57%，批号 J065-926-94）的对照品均购于韶远化学科技（上海）有限公司；**3** 对照品（上海迈瑞尔化学技术有限公司，含量 90.10%，批号 69767020）；**7** 对照品（含量 91.27%，批号 P09069）和辛烷磺酸钠（含量≥ 99.9%，批号 P1198262）均购于上海泰坦科技股份有限公司；乙腈、甲醇均为色谱纯，磷酸为分析纯，水为屈臣氏蒸馏水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 15 mmol/L 辛烷磺酸钠缓冲液（用磷酸调至 pH 3.3±0.2）：乙腈（90 ∶ 10），B 为乙腈，梯度洗脱（0—25 min，A 85%—40%；25—30 min，A 40%；30—31 min，A 40 % —85 %；31—45 min，A 85 %）；流速 1.0 ml/min；检测波长 215 nm；柱温 30 ℃；进样量 25 μl。

2.2　溶液配制

2 ～ **9** 对照品贮备液：精密称取 **2** ～ **9** 对照品各 10 mg，分别置 10 ml 量瓶中，用 80%甲醇溶液溶解并定容，摇匀，制成质量浓度均为 1 mg/ml 的 **2** ～ **9** 对照品贮备液。

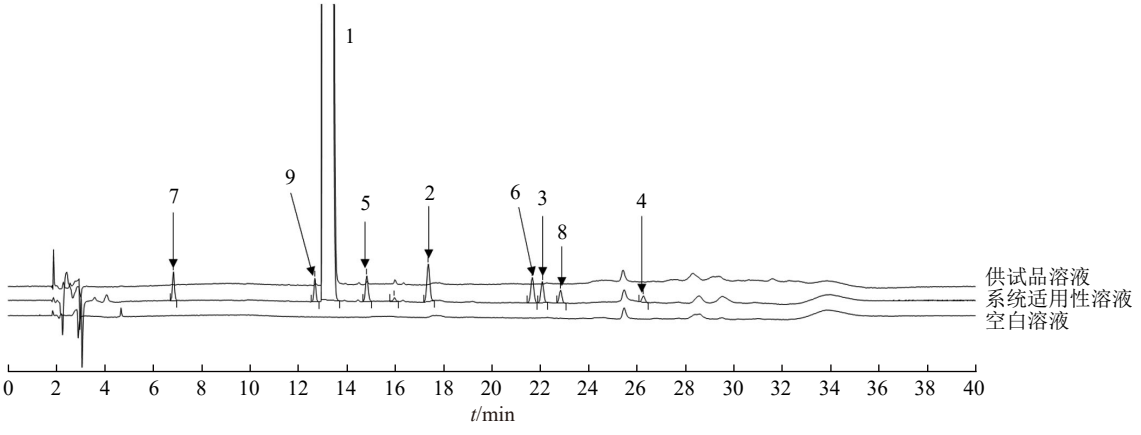
1 对照品溶液：精密称取 **1** 对照品 6 mg，置 10 ml 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，即得 **1** 对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药 6 mg，置 10 ml 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，即得供试品溶液。

对照溶液（0.1%自身对照溶液）：精密量取供试品溶液 0.1 ml，置 100 ml 量瓶中，用水定容，摇匀即得。

2.3　系统适用性试验

精密称取 **1** 原料药（批号 20210702）6 mg，置 10 ml 量瓶中，加入“**2.2**”项下的 **2** ～ **9** 对照品贮备液各 600 μl，用水溶解并定容，摇匀，作为系统适用性溶液。取空白溶液（水）、“**2.2**”项下供试品溶液（**1** 原料药批号 20210702）和上述系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，记录色谱图（图 2）。结果显示，空白溶液对 **1** 及各杂质色谱峰均无干扰，系统适用性溶液中各色谱峰间最小分离度均 >1.5，供试品溶液中各色谱峰分离良好。



1－**1**；2－**2**；3－**3**；4－**4**；5－**5**；6－**6**；7－**7**；8－**8**；9－**9**

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatogram

2.4 破坏试验

称取 **1** 原料药（批号 20210702）6 mg，各 6 份，分别进行下列试验。①用水溶解后定容至 10 ml，摇匀，作为未破坏溶液；②加 6 mol/L 盐酸 2 ml，于 90 ℃水浴中加热 24 h，加 6 mol/L 氢氧化钠溶液 2 ml 中和，再加甲醇定容至 10 ml，摇匀，作为酸破坏溶液；③加 6 mol/L 氢氧化钠溶液 2 ml，于 90 ℃水浴中加热 24 h，加 6 mol/L 盐酸 2 ml 中和，再加甲醇定容至 10 ml，摇匀，作为碱破坏溶液；④加水溶解并定容至 10 ml，摇匀，密封，置光照强度为（4 500±500）lx 的光照稳定性箱中 30 d，取出，作为光破坏溶液；⑤加水 2 ml，于 90 ℃水浴中加热 24 h，取出后加水定容至 10 ml，摇匀，作为高温破坏溶液；⑥加 10%过氧化氢溶液 2 ml，于 90 ℃水浴中加热 3 h，加水溶解并定容至 10 ml，摇匀，作为氧化破坏溶液。精密量取上述破坏溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，同时采用二极管阵列检测器（DAD）进行紫外扫描，波长扫描范围为 200 ～ 400 nm。结果见图 3。

可见，**1** 在酸、碱与高温条件下较为稳定；光照条件下产生已知杂质 **9** 与未知杂质 U_6 与 U_7；氧化破坏条件下产生已知杂质 **9** 与未知杂质 U_1 ～ U_5。各条件下所产生的破坏产物与 **1** 均能较好分离，各破坏产物之间也能较好地分离，峰含量分析显示各破坏溶液的色谱图中 **1** 为单一峰，峰含量 >990，物料平衡。

2.5 定量限和检测限

精密称取 **1** 对照品 10 mg 置 10 ml 量瓶中，加水溶解并定容，摇匀，精密移取上述溶液 600 μl，再取“**2.2**”项下的 **4** 和 **8** 对照品贮备液各 1.5 ml，以及其余杂质对照品贮备液各 600 μl，置同一 100 ml 量瓶中，用水定容，即为定量限溶液。以信噪比（*S*/*N*）>10 计算定量限。结果显示，**1**、**2**、**3**、**5**、**6**、**7**、**9** 的定量限为 0.1 μg/ml，**4** 和 **8** 的定量限为 0.3 μg/ml。定量限下，连续进样 6 次时 **1** ～ **9** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别 7.04%、3.0%、7.6%、7.9%、7.1%、9.5%、4.9%、6.0%、6.3%。

取上述定量限溶液 5 ml 置 10 ml 量瓶中，用水稀释、定容后进样分析，按 *S*/*N*>3 计算检测限。结果显示，**1**、**2**、**3**、**5**、**6**、**7**、**9** 的检测限为 0.05 μg/ml，**4** 和 **8** 的检测限为 0.15 μg/ml，表明本法灵敏度较好。

2.6 线性试验

精密称取 **1** 对照品 15 mg 置 50 ml 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀；分别移取上述溶液及“**2.2**”项下的 **2** ～ **9** 对照品贮备液适量，用水稀释，制成质量浓度分别为 6 μg/ml 的混合线性贮备液，并逐步稀释成质量浓度为 0.012、0.030、0.060、0.090、0.120、0.600 μg/ml 的系列线性试验溶液。

精密量取上述系列线性试验溶液各 25 μl，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，以 **1** 和杂质 **2** ～ **9** 的质量浓度（*c*）为横坐标、其对应的峰面积（*A*）为纵坐标，进行线性回归，分别以 **1** 的线性方程斜率与杂质 **2** ～ **9** 的线性方程斜率的比值为杂质 **2** ～ **9** 的相对校正因子。结果见表 1，杂质 **2** ～ **9** 的校正因子为 0.43 ～ 2.19。

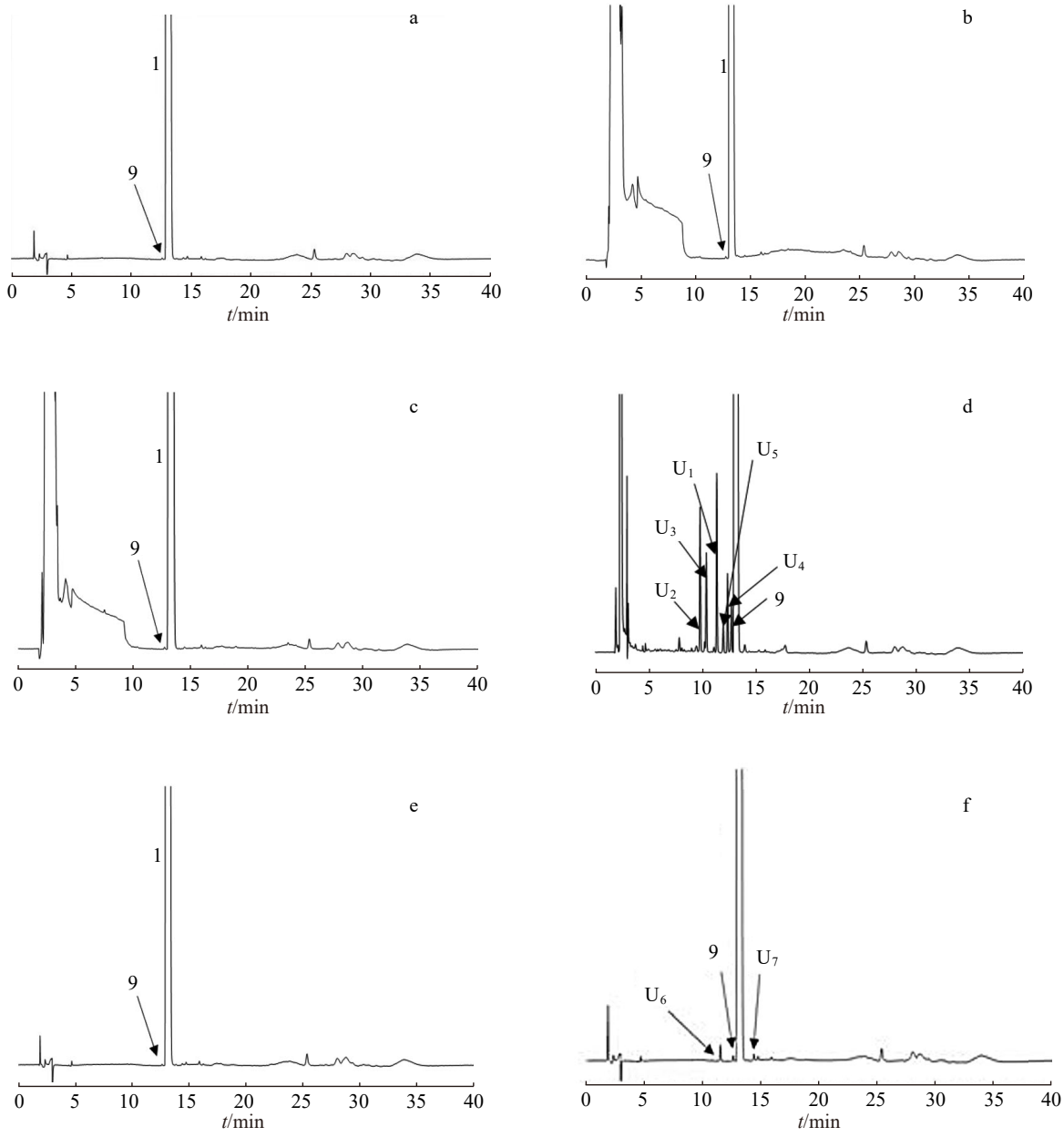
表 1 线性试验结果

Tab.1 Results of Linearity Test

化合物	线性方程	相关系数*r*	线性范围/μg·ml^{-1}	校正因子
1	*A*=1.489 2*c*+0.053 1	0.999 9	0.106 6～5.330 8	–
2	*A*=3.464 5*c*+0.145 7	0.999 8	0.135 9～6.793 3	0.43
3	*A*=2.243 8*c* – 0.002 6	1.000 0	0.128 8～6.138 5	0.66
4	*A*=0.679 3*c* – 0.005 6	1.000 0	0.287 8～5.755 7	2.19
5	*A*=2.123 9*c*+0.061 6	0.999 9	0.135 3～6.762 9	0.70
6	*A*=2.144 4*c*+0.035 8	0.999 9	0.163 5～8.173 0	0.69
7	*A*=1.917 6*c*+0.051 6	0.999 9	0.117 2～5.859 5	0.78
8	*A*=1.025 9*c*+0.014 2	1.000 0	0.345 8～6.916 9	1.45
9	*A*=1.410 5*c*+0.019 3	0.999 9	0.125 2～6.260 6	1.06

2.7 回收率试验

分别精密称取 **1** 原料药（批号 20210702）6 mg 置 10 ml 量瓶中，共 9 份，分别加入“**2.2**”项下 **2** ～ **9** 对照品贮备液适量，制成低、中、高水平（添加质量浓度分别为 0.3、0.6、0.9 μg/ml，即 50%、100%、150%各杂质限度水平）的加标溶液；另取“**2.5**”项下定量限溶液，共 3 份；此 12 份溶液按“**2.2**”项下方法配制成 0.1%自身对照溶液；另按“**2.2**”项下方法配制 2 份供试品溶液（批号 20210702）；按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，计算平均回收



a：未破坏，b：酸破坏，c：碱破坏，d：氧化破坏，e：高温破坏，f：光破坏

1－**1**；9－**9**；U_1～U_7－未知降解杂质

图 3　破坏性试验色谱图

Fig.3　Chromatograms of Stress Tests

率。结果显示，**2**～**9** 的平均回收率（*n*=12）分别为 106.6%、103.1%、104.8%、105.5%、100.3%、105.2%、104.6%、104.2%；RSD 分别为 5.7%、6.0%、6.1%、4.7%、8.7%、2.6%、4.1%、4.8%。

2.8　精密度试验

2.8.1　重复性试验

取 **1** 原料药（批号 20210702）适量，按“**2.7**”项下中水平样品配制方法平行配制 6 份加标样品溶

液及 0.1%自身对照溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，计算单个杂质与总杂质含量，并计算其 RSD 值。结果显示，**2** ～ **9** 含量的 RSD（*n*=6）分别为 2.6%、3.4%、5.5%、1.5%、2.1%、1.2%、4.6%、1.1%，总杂质含量 RSD（*n*=6）为 1.4%，表明该方法重复性良好。

2.8.2 中间精密度试验

由不同试验人员、使用不同的仪器与色谱柱、在不同日期对重复性试验项下相同批次的 **1** 原料药进行分析，按“**2.7**”项下方法平行配制加标样品溶液及其 0.1%自身对照溶液，平行操作 6 份，连续注入液相色谱仪，计算 6 份样品的 RSD 值及 2 个试验人员制备的 12 份样品的 RSD 值。结果显示，12 份样品中，**2** ～ **9** 含量的 RSD（*n*=12）分别为 7.7%、7.2%、11.0%、8.4%、5.0%、9.1%、10.6%、8.4%，总杂质含量的 RSD（*n*=12）为 7.9%，表明该方法的中间精密度能达到要求。

2.9 稳定性试验

取“**2.7**”项下中水平的加标样品溶液，并制备 0.1%自身对照溶液，在 0 h 按“**2.1**”项下色谱条件进样分析；并将加标样品溶液置于冰箱（4 ℃）中，分别在 12、33 和 52 h 时取样测定，记录 **1** 及各杂质峰面积。结果表明，在 4 ℃冷藏条件下，0.1%自身对照溶液在不同稳定性时间点的峰面积与 0 h 时峰面积的比值为 95.0%～ 105.0%，加标样品溶液在不同稳定性时间点的杂质含量与 0 h 时比较，单个杂质的绝对差值≤ 0.02%，总杂质绝对差值≤ 0.10%，说明加标样品溶液及其 0.1%自身对照溶液冷藏（4 ℃）52 h 内稳定性良好。

2.10 耐用性试验

取“**2.7**”项下中水平的加标样品溶液，并制备 0.1%自身对照溶液，按“**2.1**”项下色谱条件，分别考察流动相 pH（3.3±0.2）、柱温［（30±5）℃］、检测波长［（215±2）nm］、流速［（1.0±0.2）ml/min］以及同型号不同批次的色谱柱（USUXA27241、USUXA42022）对 **1** 与其他杂质分离效果的影响。结果显示，在不同耐用性色谱条件下，**1** 与其他杂质峰及各杂质峰之间的分离度均 >1.5，且与“**2.1**”项下条件相比，加标样品溶液所测得单个杂质的差值≤ 0.03%，总杂差值≤ 0.10%，说明此方法耐用性良好。

2.11 样品测定

取 3 批 **1** 原料药，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果见表 2，除列出杂质外，其余杂质均未检出。

表 2 1 有关物质的测定结果 /%

Tab.2 Determination Results of the Related Substances in **1**/%

批号	**5**	**9**	最大未知单杂	总杂质
20210702	0.01	0.01	0.02	0.07
20210706	0.01	0.01	0.02	0.07
20210720	0.04	0.08	0.02	0.15

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用 DAD 对 **1** 及杂质 **2** ～ **9** 进行全波长扫描，DAD 图谱结果显示，**1** 在 198、212 和 263 nm 有最大吸收波长，在 263 nm 下的吸收较弱；杂质 **2** ～ **9** 在 192 ～ 207 nm 间有最大吸收。JP 18 选用 215 nm 作为检测波长，且考虑到低波长下的背景吸收干扰，最终选择 215 nm 作为 **1** 有关物质的检测波长。

3.2 色谱条件的优化

采用 JP 18 的色谱条件对 **1** 与各已知杂质的分离度进行考察，结果显示，各已知杂质不能达到完全分离。

因此，在 JP 18 方法的基础上对洗脱梯度及色谱柱进行筛选。分别选取了 Waters XBridge C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）和 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）。经对比，最终选择柱效、峰形及分离度较好的 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱；在流动相体系的优化方面，在 JP 18 收载的流动相体系上增加流动相梯度的考察，最终选择了“**2.1**”项下的色谱条件，经试验，建立的色谱条件能完全分离各个峰，可以较好满足 **1** 有关物质的检测要求。

3.3 有关物质测定方法的选择

由于 **1** 及各杂质的最大紫外吸收不同，在规定的 215 nm 下响应也不同。故采用加校正因子的主成分自身对照法，能更准确地控制 **1** 原料药的质量。

（下转第1226页）

参考文献：

[1] 国家药品监督管理局. 无菌工艺模拟试验指南(无菌制剂)[EB/OL]. (2018-09-11)[2022-01-15]. https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxqtgg/20180911170301439.html.

[2] FDA. Guidance for industry: sterile drug products produced by aseptic processing–current good manufacturing practice [EB/OL]. (2004-09-01)[2022-01-15]. https://www.fda.gov/media/71026/download.

[3] PMDA. Guidance on the manufacture of sterile pharmaceutical products by aseptic processing in Japan [EB/OL]. (2011-04-01)[2022-01-15]. http://www.pmda.go.jp/files/000153543.pdf.

[4] EU. Guideline to good manufacturing practice medicinal products for human and veterinary use, annex 1: manufacture of sterile medicinal products (the second targeted consultation) [EB/OL]. (2020-02-20)[2022-01-15]. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/gmp/2020_annex1ps_sterile_medicinal_products_en.pdf.

(上接第1191页)

参考文献：

[1] 徐　宁, 毛小明. 盐酸妥洛特罗贴剂的制备及体外释放度测定的研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, **36**(36): 5551-5553.

[2] SONG H, LIN J J, TAN H J, *et al*. Synthesis of high purified tulobuterol and its study of the organic impurities [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, **57**(4): 299-304.