

HPLC法测定沙美特罗替卡松粉吸入剂的有关物质

严翠霞^{1,2}, 江文明², 陈桂良², 杨永健², 王麟达^{2*}

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040 2 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 建立沙美特罗替卡松粉吸入剂有关物质的 HPLC 测定方法。方法: 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以 0.05% 磷酸溶液 - 甲醇 (97:3) 为流动相 A, 0.05% 磷酸乙腈溶液 - 甲醇 (97:3) 为流动相 B, 进行梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 228 nm; 柱温 40 °C。结果: 沙美特罗替卡松主要成分峰与其相关物质峰完全分离, 沙美特罗和丙酸氟替卡松浓度分别在 0.045~4.5 μg · mL⁻¹ 和 0.01~10.14 μg · mL⁻¹ 范围内呈良好线性关系, 最低检测限 (S/N ≥ 3) 分别为 4 ng 和 1 ng。结论: 该方法专属性好, 精密度、稳定性符合要求, 方法可靠, 可用于沙美特罗替卡松粉吸入剂有关物质的测定。

关键词: 沙美特罗替卡松粉吸入剂; 有关物质; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2010)01-0082-06

HPLC determination of related substances in salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder for inhalation

YAN Cui-xia^{1,2}, JIANG Wen-ming², CHEN Gui-liang², YANG Yong-jian², WANG Lin-da^{2*}

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Shanghai 200040 China 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of related substances in salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder for inhalation. **Methods** The column was Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). Mobile phase consisted of A (0.05% phosphoric acid solution - methanol 97:3) and B (0.05% phosphoric acid solution in acetonitrile - methanol 97:3) with gradient program. The flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹ and detected at 228 nm. The temperature of column was set at 40 °C. **Results** The related substances were completely separated from salmeterol and fluticasone propionate. The linearity of salmeterol and fluticasone propionate concentration were in the ranges of 0.045~4.5 μg · mL⁻¹ and 0.01~10.14 μg · mL⁻¹, respectively. The detection limits (S/N ≥ 3) were 4 ng and 1 ng respectively. **Conclusion** The method is specific, accurate and stability. The proposed HPLC method can be used for the determination of related substances in salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder for inhalation.

Key words salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder for inhalation; related substances; HPLC

粉雾剂是将 1 种或多种药物微粉化后, 单独或与辅料混合后, 经特殊的给药装置使药物以粉雾状进入呼吸道和肺部发挥局部或全身的作用, 由于在制剂过程中的微粉化过程对药物的稳定性具有挑战性, 且肺部给药的特殊性, 使得其有关物质控制显得更为重要。

沙美特罗替卡松粉吸入剂 (舒利迭) 是由葛兰素史克公司研发的用于治疗成人及儿童哮喘的吸入型药物, 其结合了主要成分丙酸氟替卡松和沙美特罗疗效的互补作用, 因此既有抗炎又有持续的支气

管扩张作用, 成为临床控制哮喘的重要药物^[1]。本品的活性成分量少 (微克级) 且为复方制剂, 其规格有每吸含沙美特罗 50 μg 和丙酸氟替卡松 100 μg, 每吸含沙美特罗 50 μg 和丙酸氟替卡松 250 μg 以及每吸含沙美特罗 50 μg 和丙酸氟替卡松 500 μg 3 种。目前已有文献报道高效液相色谱法测定沙美特罗有关物质^[2]和丙酸氟替卡松有关物质^[3], 但关于含沙美特罗和丙酸氟替卡松的该药中有关物质的测定国内外未见有文献报道。本实验拟建立测定沙美

* 通讯作者 Tel: (021) 50798203 E-mail: wanglinda@sn-da.gov.cn

特罗替卡松粉吸入剂有关物质的 HPLC 法, 并对方法进行了验证。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型 HPLC 仪 (G1312A 二元泵, G1322A 脱气机, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314B DAD 检测器, Chemstation 色谱工作站)。

对照品羧基甲酸沙美特罗 (含量为 98.8%)、丙酸氟替卡松 (含量为 99.4%) 均为葛兰素史克公司产品; 沙美特罗替卡松粉吸入剂 (批号: R40119Q, R402131, R401188 规格: 每吸含沙美特罗 50 μg 和丙酸氟替卡松 250 μg)。乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 实验用水为重蒸水。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 取本品 60 泡, 精密称定, 将封条打开, 倾出封条上每泡中的内容物, 混匀, 再将封条拭净, 精密称定封条的重量, 求得每泡的平均重量。精密称取内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.5 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 适量, 振摇使溶解, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液即得。

2.2 对照品储备液 取对照品羧基甲酸沙美特罗约 2 mg, 丙酸氟替卡松约 5 mg 使用十万分之一天平精密称定, 置同一 100 mL 量瓶中, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 70 mL, 超声使其溶解, 再用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液 精密量取对照品储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.05% 磷酸溶液 - 甲醇 (97:3), B 为 0.05% 磷酸乙腈溶液 - 甲醇 (97:3), 梯度洗脱 (0~60 min, 70% A $\rightarrow$ 22% A, 30% B $\rightarrow$ 78% B; 60~61 min, 22% A $\rightarrow$ 70% A, 78% B $\rightarrow$ 30% B); 检测波长: 228 nm; 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

4 专属性试验

取上述供试品溶液, 按“3”项下的色谱条件进样, 记录色谱图。羧基甲酸、沙美特罗、丙酸氟替卡松的保留时间分别为 9.6 min, 23.7 min 和 38.4 min, 峰形良好, 主成分与相邻杂质、各副产物的色谱峰均能达到基线分离, 分离度均大于 1.5 (图 1-A)。说明该梯度洗脱方法能够满足对未知杂质的分离要求。

5 破坏性试验

本文进行了色谱条件的专属性试验, 考察了在强制性破坏试验条件下所产生杂质的分离情况。用酸、碱、氧化、高温、强光等方式对本品进行破坏, 并用 HPLC 法进行有关物质检查。

酸破坏: 取样品内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸 1 mL, 摇匀, 置 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中破坏 1 h, 取出放冷, 加 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和后, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 5 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液待测。

碱破坏: 取样品内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 摇匀, 置 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中破坏 1 h, 取出放冷, 加 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸 2 mL 中和后, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 5 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液待测。

氧化破坏: 取样品内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 置 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下破坏 1 h, 取出放冷后, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 5 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液待测。

热破坏: 取样品内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加水 2 mL 后, 置 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 1 h, 取出放冷后, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 5 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液待测。

光破坏: 取样品内容物适量 (约相当于沙美特罗 0.25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 在强光 (4500 k) 下照射约 6 h 后, 加 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 5 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液待测。

分别取上述 5 种续滤液, 按“3”项下的色谱条件进样, 记录色谱图。破坏后的样品色谱图见图 1-C~G。结果表明, 样品对酸最不稳定, 其次为碱、氧化和热, 在光照条件下较稳定。但各降解产物与主成分峰均有良好的分离, 不影响有关物质的测定。

6 线性范围、最低定量限和检测限

精密量取对照品储备液适量, 用 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 逐级稀释成沙美特罗浓度分别为 4.5, 2.25, 1.125, 0.45, 0.225, 0.1125, 0.045, 0.0045 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液以及丙酸氟替卡松浓度分别为 10.14, 5.07, 2.535, 1.014, 0.507, 0.2535, 0.1014, 0.01014 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别进样测定, 以峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归, 得沙美特罗、丙酸氟替卡松回归方程分别为:

$$A = 14.63C - 0.1961 \quad r = 0.9999$$

$$A = 38.38C + 3.524 \quad r = 0.9999$$

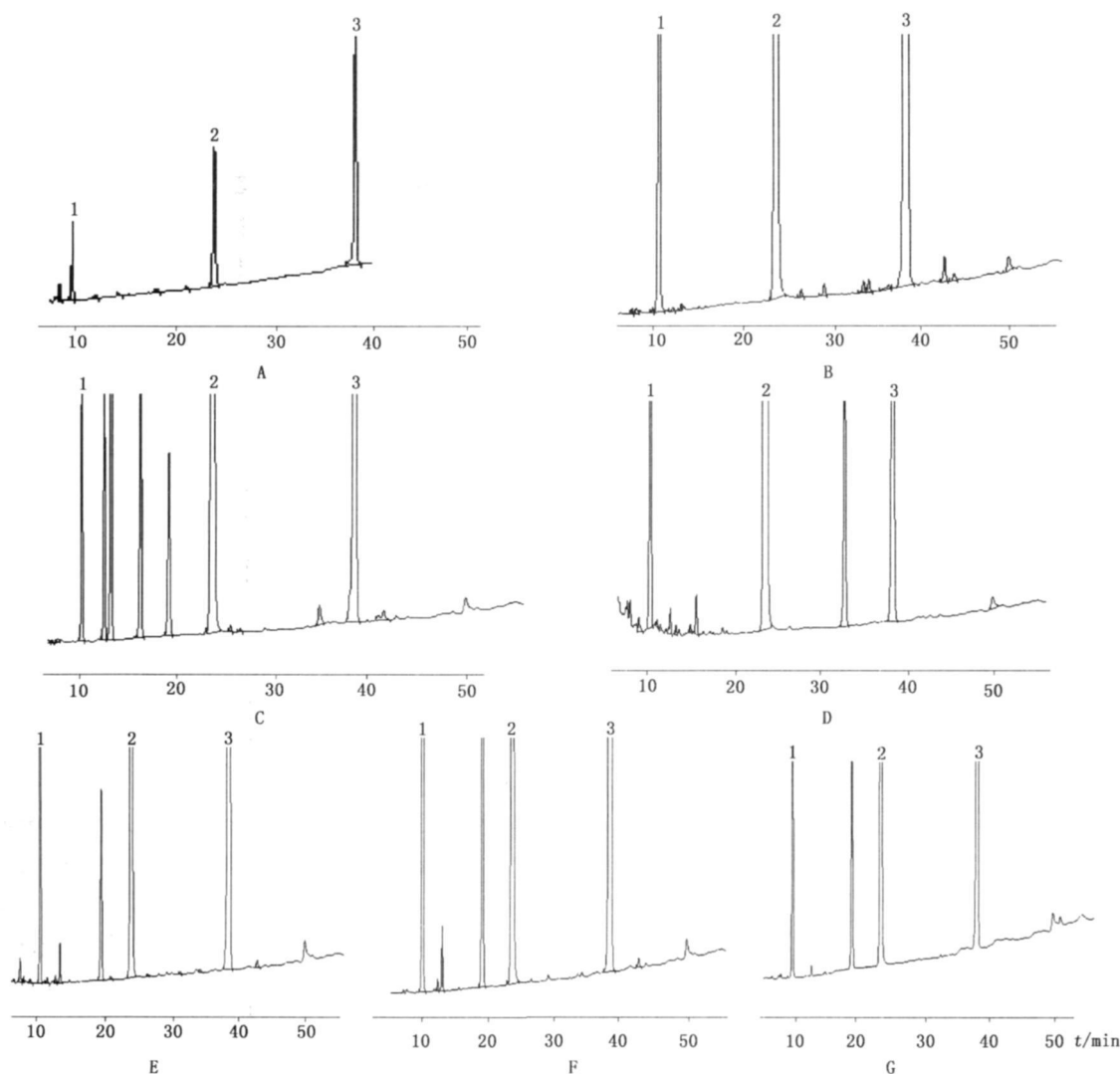


图 1 破坏性试验 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of destroyed test

A. 对照品 (reference substances) B. 样品 (sample) C. 酸破坏 (destroyed by acid) D. 碱破坏 (destroyed by alkali) E. 氧化破坏 (destroyed by oxidation) F. 热破坏 (destroyed by heat) G. 光破坏 (destroyed by light)

1 羧基甲酸 (xinafoic acid) 2 沙美特罗 (salmeterol) 3 丙酸氟替卡松 (fluticasone propionate)

结果表明, 沙美特罗和丙酸氟替卡松分别在 $0.045 \sim 4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.01 \sim 10.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

取上述对照品储备液适量, 以 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 逐渐稀释后, 进样测定, 以 10 倍噪音 ($SN \geq 10$) 计算最小定量限, 结果沙美特罗为 8 ng 丙酸氟替卡松为 2 ng 。

取上述对照品储备液适量, 以 0.05% 磷酸甲醇溶液 - 水 (70:30) 逐渐稀释后, 进样测定, 以 3 倍噪音 ($SN \geq 3$) 计算检测限, 结果沙美特罗为 4 ng 丙酸氟替卡松为 1 ng 。

7 精密度和稳定性试验

取“2.3”项下的对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录色谱图, 计算得沙美特罗和丙酸氟替卡松峰面积的 RSD 分别为 0.39% 和 0.12% 。

取供试品溶液, 分别在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 后, 依法测定, 结果表明, 单个最大杂质与丙酸氟替卡松峰面积比平均 ($n=6$) 为 0.12% , RSD 为 6.7% ; 总杂质峰面积与丙酸氟替卡松峰面积比平均 ($n=6$) 为 0.44% , RSD 为 4.7% 。

8 有关物质测定

按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 即制成每 1 mL 中含 $250 \mu\text{g}$ 丙酸氟替卡松的溶液; 另取丙酸

氟替卡松对照品适量,用 0.05% 磷酸甲醇溶液-水 (70:30)制成每 1 mL 中含 1 μ g 的溶液作为丙酸氟替卡松对照品溶液。精密量取上述 2 种溶液各 20 μ L,依法测定,采用外标法,以丙酸氟替卡松校正因子计算。3 批样品的测定结果见表 1。由表 1 可知,本品的单个未知杂质均不超过丙酸氟替卡松标示量的 0.2%;总杂质均不超过丙酸氟替卡松标示量的 0.5%。

表 1 沙美特罗替卡松粉吸入剂有关物质测定结果 (%)

Tab 1 Determination results of related substances in salmeterol xinafoate and fluticasone propionate powder for inhalation

批号 (Lot No.)	最大杂质 (maximum impurity)	总杂质 (total impurity)
R401190	0.09	0.39
R402131	0.15	0.45
R401188	0.13	0.41

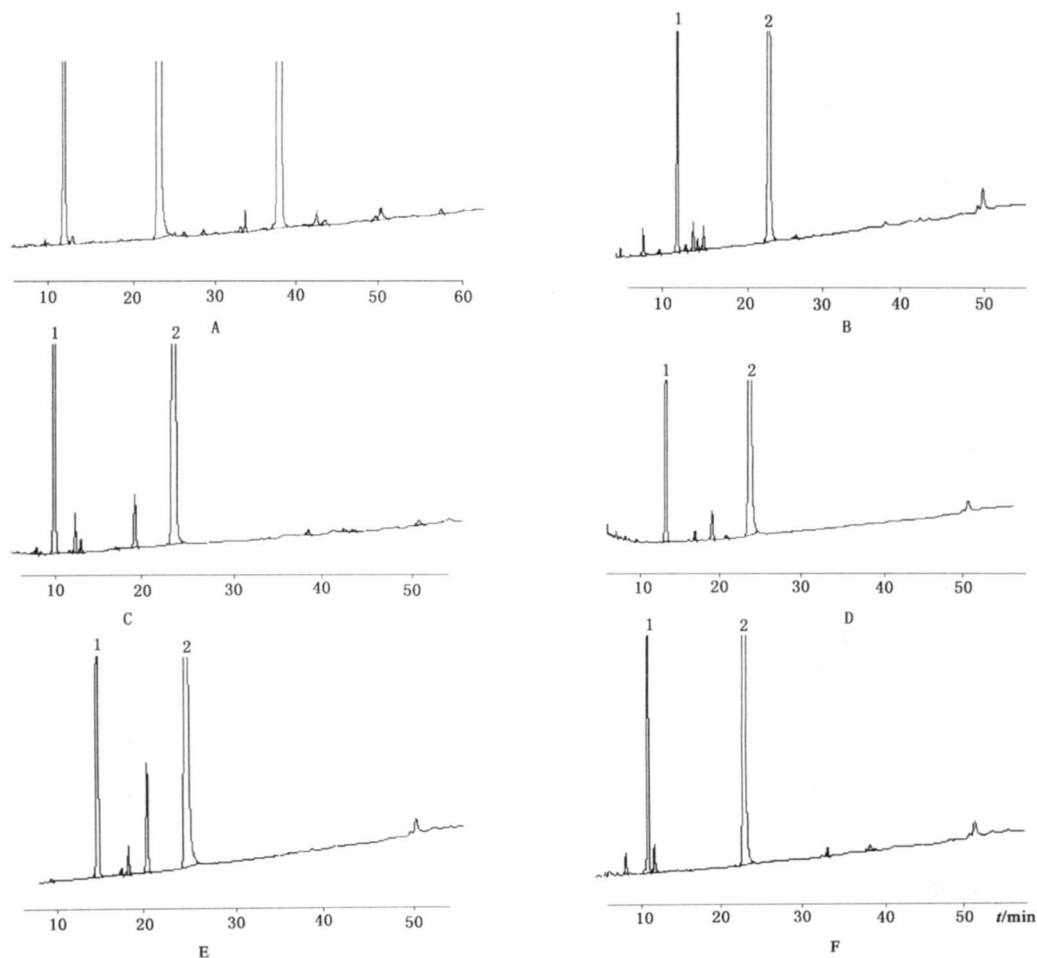


图 2 样品及羟萘甲酸沙美特罗破坏性试验的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of sample and salmeterol xinafoate destroyed test

A. 样品 (sample) B. 酸破坏 (destroyed by acid) C. 碱破坏 (destroyed by alkali) D. 氧化破坏 (destroyed by oxidation) E. 热破坏 (destroyed by heat) F. 光破坏 (destroyed by light)

1. 羟萘甲酸 (xinafoic acid) 2. 沙美特罗 (salmeterol)

9 讨论

9.1 有关物质的归属

由于本品为复方制剂,所含杂质数目多,来源具有多样性,为了确定各杂质的来源和限度,对本品中的有关物质进行了归属分析。

对羟萘甲酸沙美特罗、丙酸氟替卡松以及羟萘甲酸沙美特罗与丙酸氟替卡松按处方量的混合物分别按“5”项下方法进行了酸、碱、氧化、高温和热破坏性试验,按“3”项下的色谱条件,进行 HPLC 分析,并将获得的色谱图分别与样品的色谱图进行比较分析。样品的 HPLC 图见图 2-A,羟萘甲酸沙美特罗破坏性试验的 HPLC 图见图 2-B~E,丙酸氟替卡松破坏性试验的 HPLC 图见图 3-A~E,羟萘甲酸沙美特罗与丙酸氟替卡松按处方量的混合物破坏性试验的 HPLC 图见图 4-A~E。

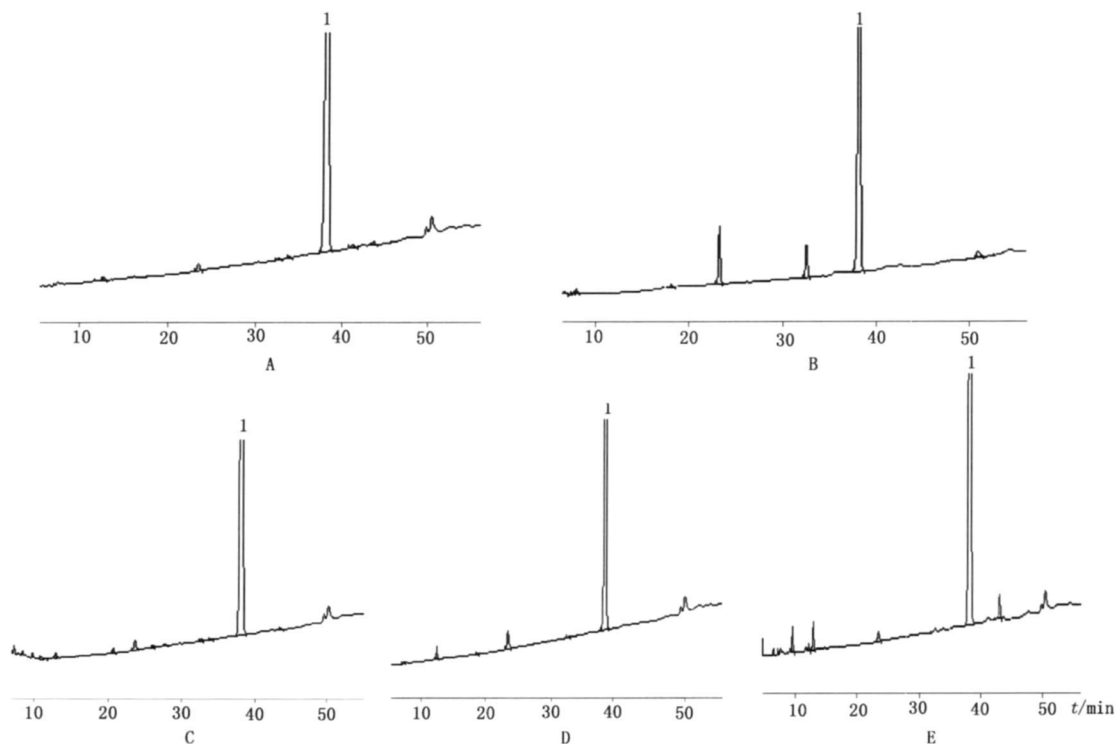


图3 丙酸氟替卡松破坏性试验的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatograms of fluticasone propionate destroyed test

A. 酸破坏(destroyed by acid) B. 碱破坏(destroyed by alkali) C. 氧化破坏(destroyed by oxidation) D. 热破坏(destroyed by heat) E. 光破坏(destroyed by light)

1. 丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)

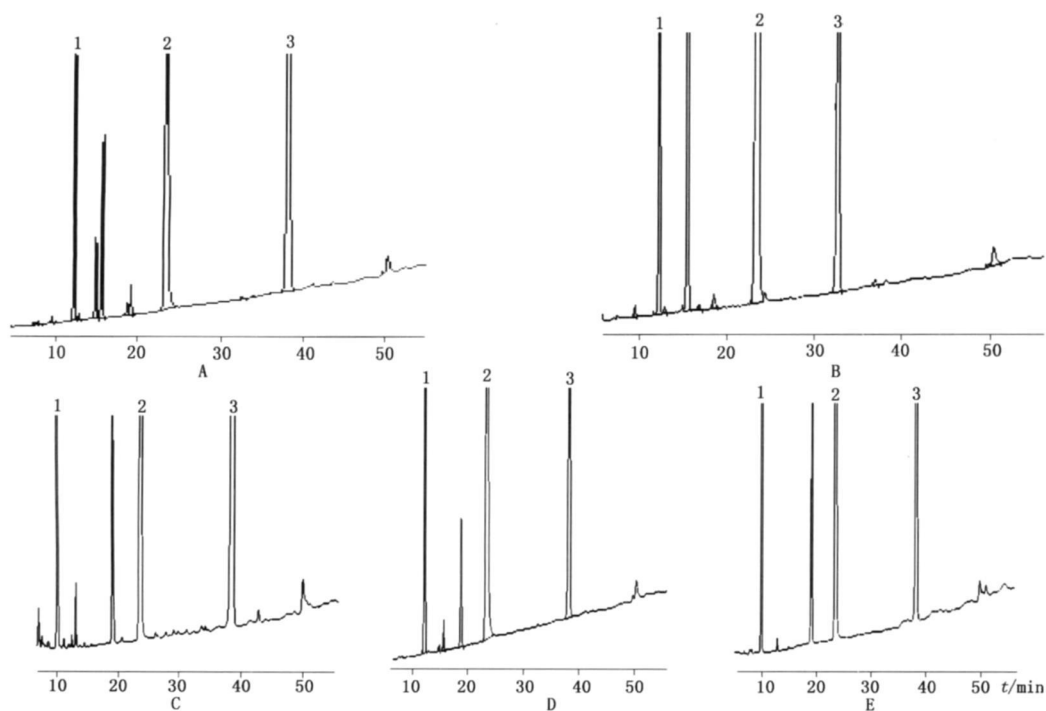


图4 羟萘甲酸沙美特罗与丙酸氟替卡松按处方量混合物破坏性试验的HPLC图

Fig 4 HPLC chromatograms of salmeterol xinafoate and fluticasone propionate destroyed test

A. 酸破坏(destroyed by acid) B. 碱破坏(destroyed by alkali) C. 氧化破坏(destroyed by oxidation) D. 热破坏(destroyed by heat) E. 光破坏(destroyed by light)

1. 羟萘甲酸(xinafoic acid) 2. 沙美特罗(salmeterol) 3. 丙酸氟替卡松(fluticasone propionate)

比较样品的 HPLC 图与羟萘甲酸沙美特罗破坏性试验 HPLC 图可知, 羟萘甲酸沙美特罗破坏性试验产生的杂质峰, 大都在 11~23 min 之间, 而样品的 HPLC 图显示样品中的杂质峰主要在 23 min 后, 故样品中的杂质大都不是来源于羟萘甲酸沙美特罗; 比较上述样品的 HPLC 图与丙酸氟替卡松破坏性试验的 HPLC 图可知, 丙酸氟替卡松破坏性试验产生的杂质峰, 保留时间大都在 23 min 后, 与样品中大多数杂质峰的保留时间相似, 由此推断, 样品中杂质大多来源于丙酸氟替卡松的降解, 又由于复方制剂中未知杂质限度的确定, 一般都以复方制剂中含量较高的主药计算, 故本实验对样品有关物质的测定, 均按外标法, 以丙酸氟替卡松的校正因子计算。

9.2 检测波长的选择 取对照品羟萘甲酸沙美特罗、丙酸氟替卡松适量, 分别用 0.05% 磷酸甲醇溶液-水 (70:30) 制成每 1 mL 含 10 μg 的溶液, 在 400~200 nm 的波长处进行扫描。结果丙酸氟替卡松最大吸收波长为 239 nm, 而沙美特罗在 239 nm 波长处吸收较低, 在 250 nm 和 216 nm 处有较大吸收。为了接近于沙美特罗、丙酸氟替卡松和羟萘甲酸的最大吸收, 同时能检测出较多的杂质峰, 选择 3 种物质响应均较强的波长 228 nm 作为检测波长。

9.3 流动相的选择 本文首先考察了乙腈-水 (梯度洗脱) 体系, 结果发现沙美特罗峰形较差, 拖尾严重; 文献 [4] 报道, 由于沙美特罗为弱碱性物质, 能与 C_{18} 柱上未反应的硅醇基相互作用, 从而导致沙美特罗峰拖尾, 峰形差, 酸化流动相并在流动相中加入少量的有机改性剂甲醇, 能改善弱碱性物质沙美特罗的峰形。

9.4 溶剂和柱温的选择 由于沙美特罗和丙酸氟替卡松在水中的溶解性均很低 (沙美特罗溶解度 $< 62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 丙酸氟替卡松溶解度 $< 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在甲醇中溶解性却较好^[4], 故选择甲醇-水作为溶剂。选择较高的柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 是由于较高的温度能增加弱碱性物质沙美特罗与固定相反应的速度, 从而改善弱碱性物质沙美特罗的拖尾^[4]。

9.5 梯度洗脱条件的选择 由于沙美特罗和丙酸氟替卡松极性相差较大, 若采用恒比例洗脱, 流动相中水相比比例较大, 丙酸氟替卡松 K' 值过大, 出峰缓慢, 且柱效不高, 若提高流动相中有机比例, 则沙美特罗峰与处方中的辅料难以分离, 故采用梯度洗脱。参考欧洲药典^[5]丙酸氟替卡松降解产物梯度洗脱条件, 对梯度洗脱条件进行了优化, 试验结果表明, 欧洲药典^[5]丙酸氟替卡松降解产物梯度洗脱条件第一时间段乙腈比例过大, 从而导致羟萘甲酸、沙美特罗、丙酸氟替卡松出峰时间均较快, 不能和处方中的有关物质完全分离。

根据上述实验结果, 将比例改为 0~60 min 内, 流动相 A: 70% $\rightarrow$ 22%, 流动相 B: 30% $\rightarrow$ 78%; 60~61 min 流动相 A: 22% $\rightarrow$ 70%, 流动相 B: 78% $\rightarrow$ 30%, 实验结果表明, 在采用上述色谱条件后, 基线基本平稳, 且羟萘甲酸、沙美特罗、丙酸氟替卡松均能与有关物质完全分开, 可用于沙美特罗替卡松粉吸入剂中有关物质的测定。

参考文献

- 1 WANG Di(王迪). The clinical observation of seretide on bronchial asthma(舒利迭治疗支气管哮喘的临床观察). *J Clin Exp Med* (临床和实验医学杂志), 2007, 6(2): 111
- 2 CUI Ying(崔莺), LI Yu(李玉), LIU Yu-cheng(刘玉成). Determination of Shamateib is related matters by HPLC (HPLC 法考察沙美特罗的有关物质). *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2004, 17(1): 21
- 3 Mistry N, Ismail M, Smith MS. Characterisation of impurities in bulk drug batches of fluticasone propionate using directly coupled HPLC-NMR spectroscopy and HPLC MS. *J Pharm Biomed Anal* 1997, 16(4): 697
- 4 Mumane D, Martin GP, Marriott C. Validation of a reverse-phase high performance liquid chromatographic method for concurrent assay of a weak base (salmeterol xinafoate) and a pharmacologically active steroid (fluticasone propionate). *J Pharm Biomed Anal* 2006, 40: 1149
- 5 EP(5.2). 2005 1627

(本文于 2009 年 12 月 1 日修改回)