

盐酸替罗非班氯化钠注射液异构体方法研究

盐酸替罗非班氯化钠注射液是一种可用于预防早期心肌梗死的药品——其主要有效成分替罗非班存在两种构型，即 S 构型和 R 构型，其中只有 S-替罗非班才具有治疗效果，对于 R-替罗非班则需要将其作为杂质进行控制。本文建立了一种用正相液相色谱法测定 R-替罗非班含量的方法，并对其专属性、检测限、定量限等指标进行了验证，证明了该方法的准确性及可靠性。

文 / 蒋芙蓉 兰香南 刘文 周慧 张德前

盐 酸替罗非班氯化钠注射液用于治疗在末次胸痛发作 12 h 之内且伴有心电图 (ECG) 改变和 / 或心肌酶升高的非 ST 段抬高型急性冠脉综合征 (NSTE-ACS) 成年患者，以预防早期心肌梗死。

目前已有国内外研究证明：盐酸替罗非班可有效改善 AMI 患者急诊 PCI 后的心功能，减轻心肌损伤，提高微血管灌注，且安全性较高^[1]，用于急性心肌梗死患者的治疗能取得较好的效果；此外，该药品还可促使患者的心肌微循环恢复正常，有效改善血浆纤溶因子与凝血因子水平，减少内皮细胞凋亡数，因此非常值得临床应用^[2]。很多其他药物与盐酸替罗非班联合使用也均可获得优于单一用药的良好临床疗效，其他药物包括阿司匹林^[3]、黄芪

桂枝五物汤^[4]、氯吡格雷^[5]、肌氨肽苷^[6]、补阳还伍汤^[7]、低分子肝素^[8]、清热活血汤^[9]等。

盐酸替罗非班氯化钠注射液中的有效成分替罗非班具有手性碳原子，在合成过程中会存在两种构型，即 S 构型和 R 构型，其中只有 S-替罗非班才具有治疗效果，R-替罗非班则为杂质，需要对其进行控制。一般采用正相色谱法检验盐酸替罗非班原料药中的 R-替罗非班，但该方法中不能含有水相，无法适用于盐酸替罗非班氯化钠注射液。过往文献中有部分研究人员采用反向色谱法测量 R-替罗非班的含量，但测试结果显示 R-替罗非班与主药 S-替罗非班分离度达不到要求，灵敏度低，且基线干扰大，方法适用性差，且通过方法优化后，分离度也无明显改善。

本文采用正相液相色谱法对 R-替罗非班进行检测，通过使用固相萃取小柱除去了盐酸替罗非

班氯化钠注射液中的水相，并对 R-替罗非班进行了富集，从而提高了检测的灵敏度。

1. 实验材料

1.1 仪器设备

高效液相色谱仪 (Agilent 1260, 安捷伦)，电子天平 (MSA6.6S-OCE-DM, 赛多利斯)，色谱柱 (CHIRACPAK® IC, 大赛璐)，固相萃取小柱等。

1.2 试剂试液

R-替罗非班对照品 (批号 1861-098A1, TLC)，正己烷 (批号 19130917G905, n-Hexane)，异丙醇 (批号 TAVGIH, 霍尼韦尔)，甲醇 (批号 WXBD1024V, Sigma)，乙二胺 (批号 201912053, 湖南汇虹试剂)，三氟乙酸 (批号 C10919649, 国药集团)，盐酸替罗非班氯化钠注射液 (批号 K20030201S, 湖南科伦制药)，氯化钠 (批号 180810, 河北华晨药业)。

本文作者均就职于湖南科伦制药有限公司；蒋芙蓉为第一作者，张德前为通讯作者。

2. 实验方法

2.1 溶液的配制

配制对照品贮备液：精密称取 R- 替罗非班对照品 2.5 mg，置 50 ml 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀。

配制对照品溶液：精密量取对照品贮备液 1 ml，置 100 ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀。

配制供试品溶液：取盐酸替罗非班氯化钠注射液 50 ml，通过已活化（用 5 ml 甲醇和 5 ml 超纯水依次冲洗）的 C18 固相萃取小柱，待溶液滴尽后，用约 10 ml 的水冲洗，然后弃去水洗液，加甲醇 5 ml 洗脱至 10 ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀。

配制系统适用性溶液：精密量取盐酸替罗非班氯化钠注射液 50 ml，加入对照品贮备液 1 ml，照供试品溶液进行制备。

配制辅料空白溶液：称取氯化

钠 4.50 g，加水 500 ml 溶解，量取 50 ml，照供试品溶液进行制备。

2.2 分析方法

色谱柱采用纤维素 - 三（3,5-二氯苯基氨基甲酸酯）键合硅胶为填充剂（CHIRALPAK IC，条件为 4.6 mm × 250 mm，5 μm）；以正己烷 - 异丙醇 - 甲醇 - 乙二胺 - 三氟乙酸（400 : 400 : 300 : 3 : 3）为流动相；紫外检测器，检测波长为 227 nm；流速为 1.0 ml/min，进样量 20 μl。

3. 实验结果

3.1 方法的专属性

（1）配制溶液

配制酸降解溶液：取盐酸替罗非班氯化钠注射液 50 ml，加入 2 mol/l HCl 1 ml，室温放置 24 h，加入 2 mol/L NaOH 1 ml 中和后，照供试品溶液进行制备。

配制碱降解溶液：取盐酸替

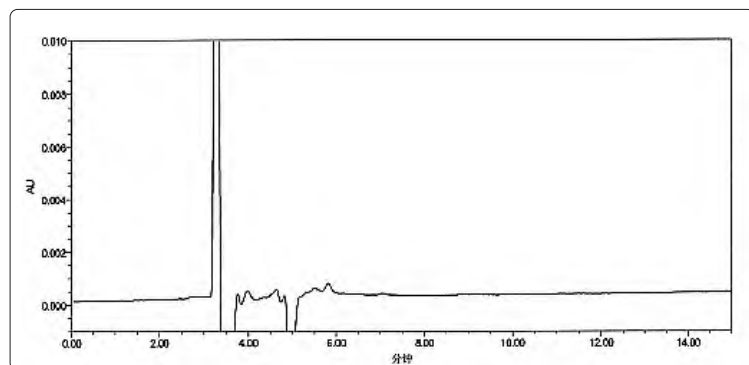


图 1 阴性空白溶液检测结果

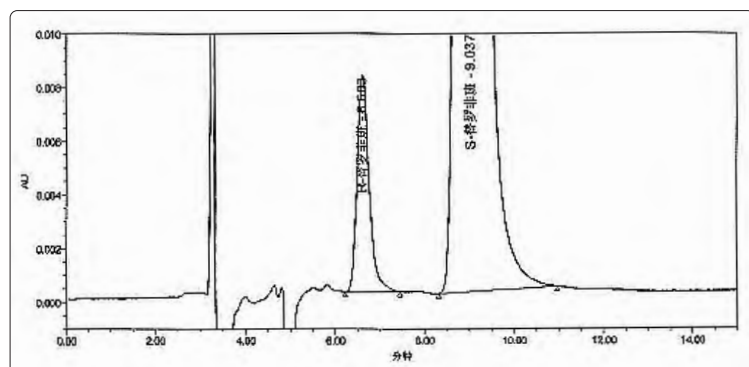


图 2 系统适用性溶液检测结果

XMETVOX[®]

从实验室到中试，再到规模化生产
我们都能提供专业的混合解决方案

- 微生物发酵
- 细胞培养
- 疫苗佐剂
- 无菌配液



勃拉精密机械(上海)有限公司
固话: +86-021-6430 7088
地址: 上海市金山区天工路285弄9号厂方A座

德国品质

罗非班氯化钠注射液 50 ml, 加入 2 mol/l NaOH 1 ml, 室温放置 24 h, 加入 2 mol/l HCl 1 ml 中和后, 照供试品溶液进行制备。

配制氧化降解溶液: 取盐酸替罗非班氯化钠注射液 50 ml, 加入 3% H_2O_2 1 ml, 室温放置 24 h, 照供试品溶液进行制备。

配制高温降解溶液: 取盐酸替罗非班氯化钠注射液于 120℃ 加热 4 h, 精密量取 50 ml, 照供试品溶液进行制备。

配制光降解溶液: 取本品在 5000 LX 光照箱中放置 10 天; 精密量取光照样品 50 ml, 照供试品溶液进行制备。

(2) 测定结果

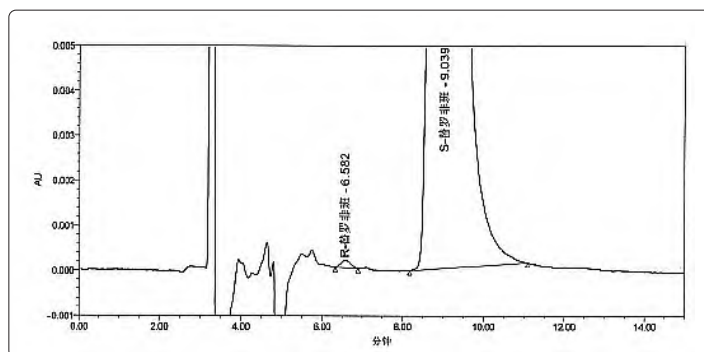
测定的典型图谱如图 1、图 2 所示, 可以看出, 阴性空白溶液不干扰 R-替罗非班的检验, 系统适用性溶液中 R-替罗非班与 S-替罗非班分离度良好, 酸、碱、氧化和高温降解溶液中 R-替罗非班与相邻峰之间的分离度也符合要求。

3.2 检测限与定量限

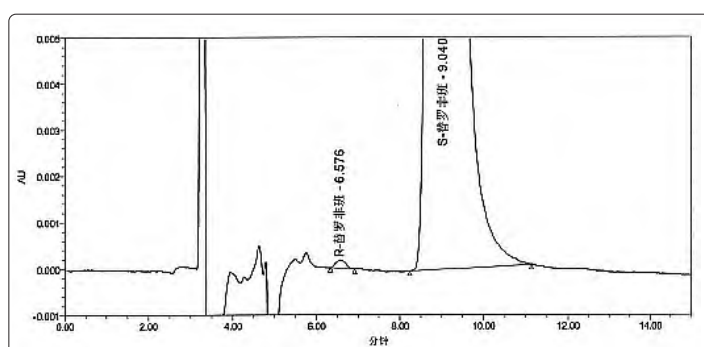
取 2.1 中的对照品贮备液适量, 逐级稀释, 以 3 : 1 信噪比对应的浓度作为检测限, 以 10 : 1 信噪比对应的浓度作为定量限。结果 R-替罗非班的检测限为 0.0474 $\mu\text{g/ml}$, 定量限为 0.0948 $\mu\text{g/ml}$, 这表明方法的灵敏度符合要求。

3.3 线性关系考察

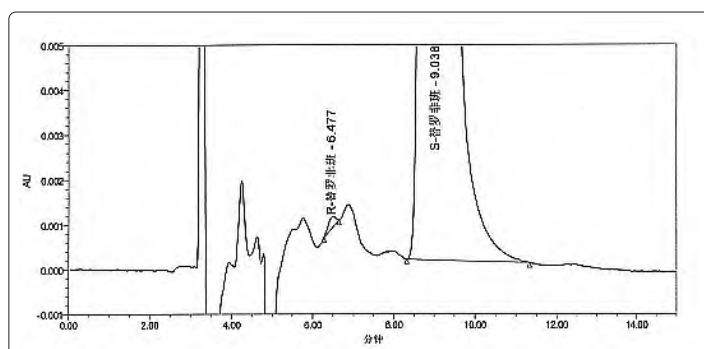
取 2.1 中的对照品贮备液适量, 用流动相将其浓度稀释为 0.0948 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.9483 $\mu\text{g/ml}$ 的线性溶液, 按照 2.2 中的方法进行测定。对于测定结果, 以浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。结果可得线性方程 $y = 29295.8077x - 361.9512$, 相



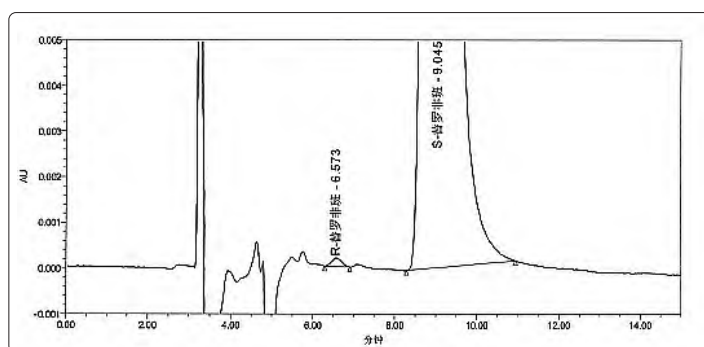
(a) 酸降解溶液



(b) 碱降解溶液



(c) 氧化降解溶液



(d) 高温降解溶液

图 3 不同溶液的检测结果

关系系数 r 为 0.9995, Y 轴截距为 100% 响应值的 2.68%, 这表明该方法的线性关系良好。

3.4 重复性试验

取同批次的盐酸替罗非班氯化钠注射液 6 份, 每份精密量取 50 ml, 分别加入 2.1 中的对照品贮备液 1 ml, 混匀。然后, 使其通过固相萃取小柱, 并弃去水溶液, 用甲醇 5 ml 洗脱至 10 ml 量瓶, 用流动相定容至刻度。结果 6 份供试品溶液中 R- 替罗非班的平均含量为 0.24%, RSD 为 1.18% ($n=6$), 这表明方法的重复性良好。

3.5 准确度试验

精密量取 2.1 中的对照贮备液 0.5 ml、1.0 ml、1.5 ml 各 3 份, 分别置于 50 ml 量瓶中, 用盐酸替罗非班氯化钠注射液稀释至刻度, 摇匀, 配制回收率溶液测定。计算回收率, 结果见表 1, 可以看到平均加样回收率为 104.6%, RSD 为 1.10% ($n=6$), 这表明实验的准确性良好。

3.6 溶液稳定性考察

取 2.1 中的对照品溶液和供试品溶液于室温条件下放置, 分别于实验开始后的 0 h、5 h、10 h 及 24 h 取样, 按照 2.2 中的方法进行测定。结果表明对照品溶液和供试品溶液在室温放置 24 h 的过程中, 峰面积的变化率均在 10% 以内, 溶液的稳定性良好。

3.7 耐用性考察

考察试验条件下变化对结果的影响, 检测波长为 227 nm $\pm$ 3 nm, 柱温为 30°C $\pm$ 5°C, 流速为 1.0 ml/min $\pm$ 0.2 ml/min, 流动相比比例 $\pm$ 50, 甲醇洗脱量为 5 ml $\pm$ 1 ml。结果 R- 替罗非班的平均检出含量为 0.25%, RSD 为 4.72% ($n=14$), 这表明方法的耐用性良好。

表 1 准确度验证结果汇总

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.37	3.61	103.22	104.6	1.10
2.37	3.68	105.58		
2.37	3.66	104.72		
4.47	6.09	103.73		
4.47	6.23	106.64		
4.47	6.11	104.08		
7.11	8.67	105.49		
7.11	8.58	104.13		
7.11	8.52	103.38		

3.8 样品含量的测定

取三批盐酸替罗非班氯化钠注射液, 用它们依次制备 2.1 中的供试品溶液, 按照 2.2 中的方法进行样品检测, 按外标法以峰面积计算。结果三批样品中 R- 替罗非班的含量均在 0.2% 以内。

4. 结论

本文建立了一种测定盐酸替罗非班氯化钠注射液中 R- 替罗非班含量的新方法, 通过固相萃取小柱除去了注射液中的水相, 使得正向色谱法得以应用; 并对 R- 替罗非班进行了富集, 提高了检测的灵敏度。经实验验证, 该方法的专属性、检测限、定量限、线性关系、重复性、准确度、溶液稳定性和耐用性等指标均符合要求, 适用于盐酸替罗非班氯化钠注射液中 R- 替罗非班检查。 ●

【参考文献】

[1] 陶信, 刘双, 田进杰. 盐酸替罗非班对急性心肌梗死患者急诊经皮冠状动脉介入术后心功能的影响 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(24): 44-46.
[2] 蔡宗祥, 孙玉梅. 盐酸替罗非班注射液对急性心肌梗死患者心肌微循环的改善作用 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(24): 43-45.
[3] 郭桂英. 盐酸替罗非班联合阿司匹林治疗

前循环脑梗死早期进展患者的效果 [J]. 中国民康医学, 2021, 33(15): 1-3.
[4] 隋海涛. 黄芪桂枝五物汤与盐酸替罗非班氯化钠注射液联合治疗急性心肌梗死经皮冠状动脉介入治疗术后患者效果观察 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(23): 78-80.
[5] 陈培, 蒋慧娟, 翟晓雅, 程仁力. 盐酸替罗非班联合氯吡格雷治疗不稳定型心绞痛患者疗效及对心电图的影响 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(09): 1041-1043.
[6] 乔秋博, 刘鑫. 盐酸替罗非班联合肌酐肽苷治疗冠心病合并脑梗死的效果及对神经功能、应激水平和凝血指标的影响 [J]. 血栓与止血学, 2021, 27(04): 625-626+629.
[7] 鲁红伟, 王丽萍, 王文艳. 补阳还五汤联合盐酸替罗非班治疗急性脑梗死临床研究 [J]. 新中医, 2020, 52(19): 44-47.
[8] 徐修章. 盐酸替罗非班联合低分子肝素治疗急性下肢深静脉血栓的疗效 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(04): 165+190.
[9] 李国彬, 习元堂, 袁丽仪, 等. 清热活血汤口服、盐酸替罗非班冠脉内注射辅助治疗急性 ST 段抬高型心肌梗死临床观察 [J]. 山东医药, 2019, 59(33): 48-52.