

制药

# 正相高效液相色谱法检测左羟丙哌嗪制剂中的右羟丙哌嗪含量

## 作者

李学普、杜敏

1Thermo Fisher Scientific, 中国上海

2Thermo Fisher Scientific, 美国波士顿

## 关键词

Vanquish Access HPLC; 右羟丙哌嗪;  
左羟丙哌嗪; 高效液相色谱法; 正相  
色谱; 中国药典 (2020 年版); 系统  
适用性试验

## 应用优势

- Thermo Scientific™ Vanquish™ Access 高效液相色谱 (HPLC) 系统在正相高效液相色谱分析应用中可确保峰面积和保留时间的高度一致性和良好的重现性。
- 提供一种可靠性和灵敏度都极高的方法，可以准确地检测左羟丙哌嗪制剂中的右羟丙哌嗪含量。

## 目标

证明 Vanquish Access HPLC 系统在应用正相 HPLC 方法分析右羟丙哌嗪含量时具备可靠且卓越的性能。

## 引言

羟丙哌嗪是一种外周性镇咳剂，通过作用于外周受体及其传入导体，发挥抑制咳嗽反射的作用。它是一种手性镇咳药物，有两种对映体：左羟丙哌嗪和右羟丙哌嗪。<sup>1</sup> 左羟丙哌嗪是目前市场上常用的镇咳药物，其镇咳效果好，副作用极小，药物依赖性风险较低。<sup>2</sup> 而右羟丙哌嗪因具有明显的中枢镇静作用和药物依赖性，因此被视为左羟丙哌嗪制剂中的对映体杂质。为保证左羟丙哌嗪制剂的药物质量并降低其副作用，分析左羟丙哌嗪制剂中的右羟丙哌嗪含量是非常关键的。

本研究采用《中国药典（2020 年版）》所述正相 HPLC 方法通过 Vanquish Access HPLC 系统分析左羟丙哌嗪制剂中的右羟丙哌嗪含量。<sup>3</sup> 除《中国药典（2020 年版）》列出的系统适用性 (SST) 试验标准以外，本研究还进一步评估了其他的关键方法性能特征，包括线性范围、检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)、准确度、日内重复性和日间重复性等。将研究结果与《中国药典（2020 年版）》中规定的接受标准进行比较，结果表明 Vanquish Access HPLC 系统具有卓越可靠的性能。图 1 为本次研究所用左羟丙哌嗪及其相关化合物右羟丙哌嗪的化学结构。

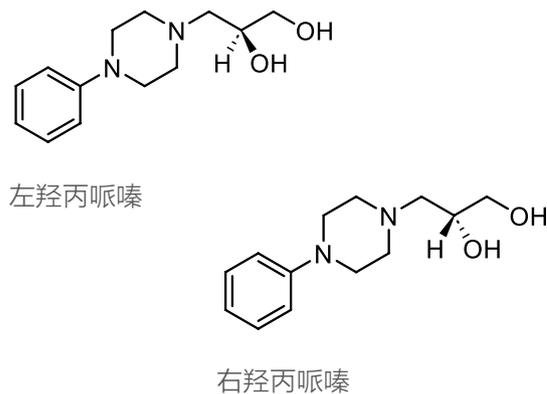


图 1. 左羟丙哌嗪和右羟丙哌嗪的化学结构

## 实验

### 化学品和药品

化学品名称	零件号
去离子水由 Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ Pro 水纯化系统制备，电阻率为 18.2 MΩ·cm 或更高	50131948
Fisher Chemical™，正己烷，HPLC 级	H302-4
Thermo Scientific Chemicals™，无水乙醇，HPLC 级	C44574
Thermo Scientific Chemicals™，二乙胺 99+%	AAA11716AE
左羟丙哌嗪标准品，中国食品药品检定研究院（NIFDC），99.9%	100678
右羟丙哌嗪标准品，NIFDC，99.0%	100967
左羟丙哌嗪胶囊，购自本地药房	不适用

### 样品处理

化学品名称	零件号
Thermo Scientific™ Finnpiptette™ F1 可变量程单通道移液器	4641010N
Thermo Scientific™ SureSTART™ 2 mL 玻璃螺口样品瓶	6ASV9-2P
Thermo Scientific™ SureSTART™ 9 mm 螺旋盖，带隔垫	6ASC9ST1

### 仪器

产品	零件号
<ul style="list-style-type: none"> <li>Vanquish Access HPLC 系统包括：</li> <li>四元泵 AN</li> <li>分流进样器 AT</li> <li>柱温箱 A</li> <li>可变波长检测器 A</li> <li>标准流通池，不锈钢，11μL</li> </ul>	VA-S22-A-01

## 样品制备

按照《中国药典（2020年版）》制备溶剂、供试品溶液、对照溶液和系统适用性溶液。

**溶剂：**正己烷：无水乙醇（60：40，v/v）。

**储备溶液 (1.5 mg/mL)：**称取 12.75 mg 左羟丙哌嗪标准品，将其用 8.500 mL 溶剂进行稀释，制成左羟丙哌嗪储备溶液。称取 13.51 mg 右羟丙哌嗪标准品，将其用 9.007 mL 溶剂进行稀释，制成右羟丙哌嗪储备溶液。

**供试品溶液：**将左羟丙哌嗪储备溶液稀释 25 倍，制成浓度为 60 µg/mL 的供试品溶液。

**对照溶液：**将试验溶液稀释 200 倍，制成浓度为 0.3 µg/mL 的对照溶液。

**系统适用性溶液：**将 20 µL 右羟丙哌嗪储备溶液和 4.0 mL 左羟丙哌嗪储备溶液移入 100 mL 容量瓶中，然后加入溶剂至刻度线，制成系统适用性试验溶液。

**用于获得标准曲线的工作溶液：**将右羟丙哌嗪储备溶液稀释至 0.3 µg/mL、1.0 µg/mL、5.0 µg/mL、10.0 µg/mL、25.0 µg/mL 和 40.0 µg/mL。

**左羟丙哌嗪药品溶液：**称取约 140.0 mg 的左羟丙哌嗪胶囊样品，将其与 3.0 mL 的溶剂混合。然后将溶液超声处理 30 分钟，再以 12,000 rpm 的速度离心 10 分钟。使用上清液进行 HPLC 分析。

## 色谱条件

表 1. 色谱条件

色谱柱	Thermo Scientific™ Hypersil™ 手性 AT 柱，涂覆有直链淀粉 - 三 - (3,5- 二甲基苯基氨基甲酸酯)，250 × 4.6 mm，5 µm (货号 42105-254630)
流动相	正己烷：乙醇：二乙胺的体积比 (v:v:v) 为 80:20:0.2
流速	1.0 mL/min
柱温	30 °C
自动进样器温度	4 °C
进样体积	20 µL
检测器设置	250 nm 收集速率：10 Hz 响应时间：0.5 s

## 色谱数据系统

使用 Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.3.1 色谱数据系统 (CDS) 进行数据采集和处理。

## 结果与讨论

### 系统适用性试验

溶剂、供试品溶液、对照溶液和系统适用性溶液的色谱图表明，右羟丙哌嗪与左羟丙哌嗪分离良好，溶剂未对右羟丙哌嗪的检测造成干扰（图 2）。经计算右羟丙哌嗪峰与左羟丙哌嗪峰之间的分离度为 4.56，左羟丙哌嗪的理论塔板数为 11,611，超出了《中国药典（2020年版）》对系统适用性溶液的要求（左羟丙哌嗪峰与右羟丙哌嗪峰之间的分离度应符合要求，左羟丙哌嗪的理论塔板数高于 2,000）。

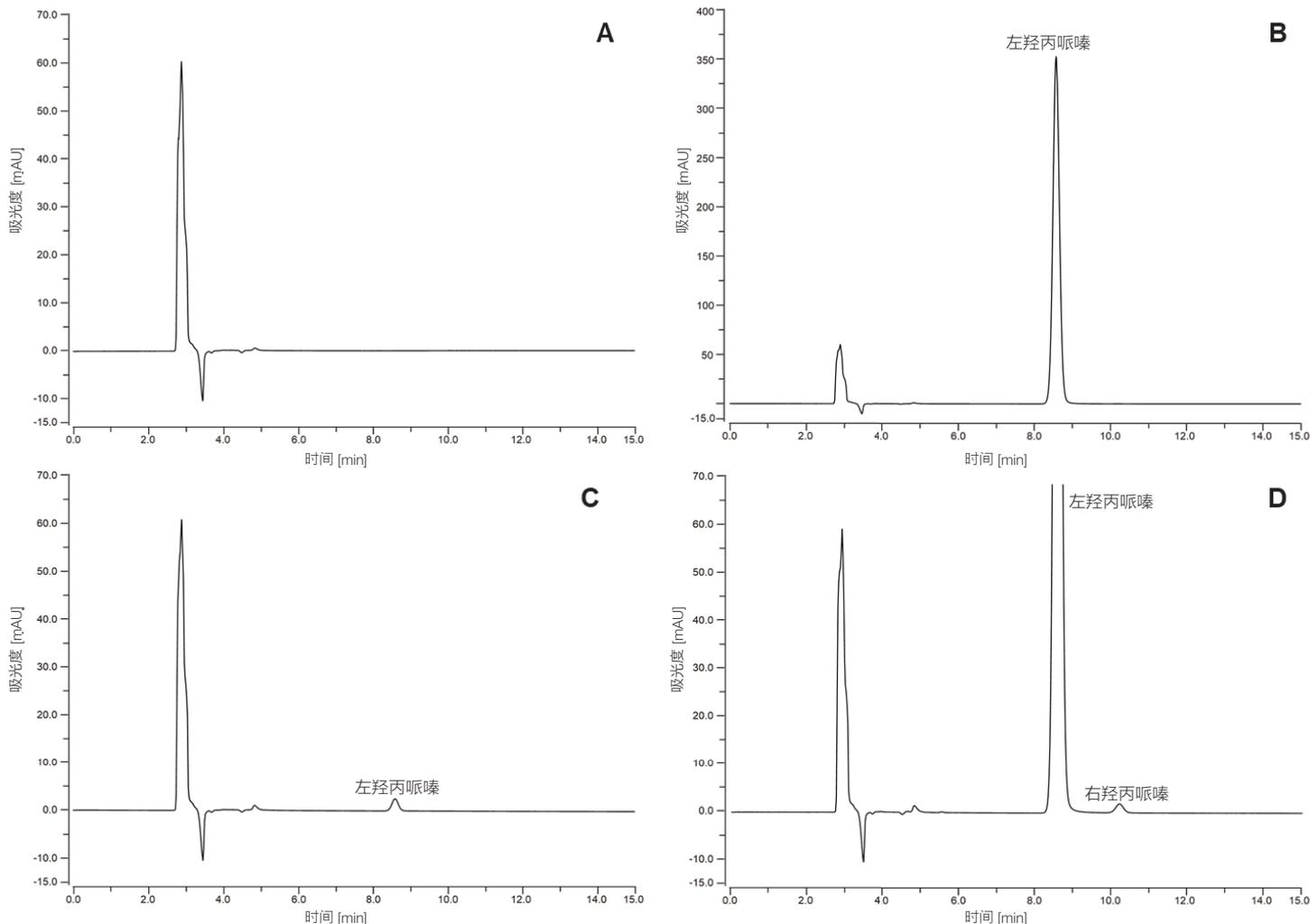


图 2. 溶剂 (A)、供试品溶液 (B)、对照溶液 (C)、系统适用性溶液 (D) 的色谱图

## LOD 和 LOQ

通过进样逐渐稀释的已知浓度的右羟丙哌嗪溶液并计算其信噪比 (S/N) 来确定 LOD 和 LOQ 值, 将 S/N 值大于 3 时的最低浓度确定为 LOD, S/N 值大于 10 时的最低浓度确定为 LOQ。右羟丙哌嗪的 LOD 为 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 平均 (n=3) S/N 为 5.7; 右羟丙哌嗪的 LOQ 为 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 平均 (n=3) S/N 为 11.3。

## 线性关系考察

依照表 1 色谱条件, 通过进样标准曲线工作溶液来确定右羟丙哌嗪测试的线性范围, 所选浓度范围应至少覆盖检测样品中右羟丙哌嗪浓度的 80% 至 120%。以右羟丙哌嗪质量浓度 (X,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标, 峰面积 (Y,  $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ) 为纵坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 所得结果如图 3 所示。标准曲线方程为  $Y = 1.0079X + 0.0098$ , 相关系数 ( $R^2$ ) 值为 0.9999。该方法的线性范围为 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$  至 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在此范围内, 可以准确检测左羟丙哌嗪制剂中的右羟丙哌嗪含量。

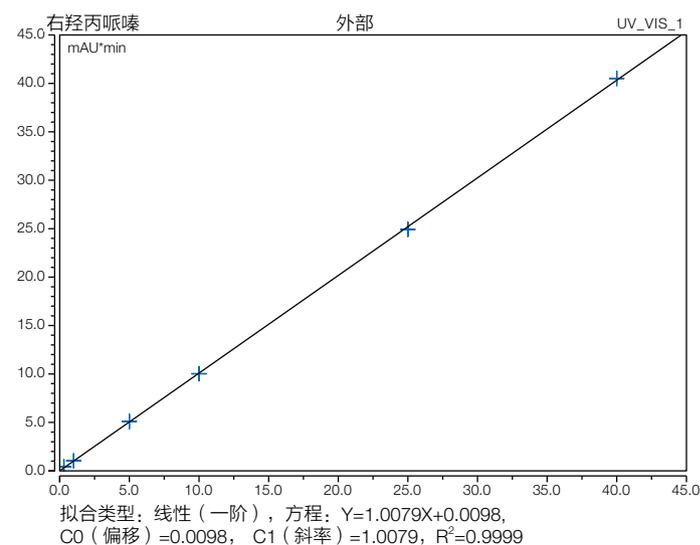


图 3. 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$  至 40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内右羟丙哌嗪的标准曲线

## 准确度

通过在左羟丙哌嗪样品溶液中加入不同浓度的右羟丙哌嗪溶液，并计算其加标回收率来评价该方法的准确度。各浓度下的加标回收率结果如表 2 所示。低浓度下回收率范围为 100.5% 至 111.0%，相对标准偏差 (RSD) 低于 10%。中高浓度下回收率范围为 94.5% 至 104.0%，RSD 低于 5%。以上结果表明，在低中高三个不同浓度下样品的加标回收率结果均处于可接受标准范围内，该方法具有良好的准确度。

## 日内和日间重现性

对三个不同组别的系统适用性溶液在一天内重复进样来评价系统的日内重现性，每组溶液重复进样六次。右羟丙哌嗪的峰不对称度，分离度，峰面积和保留时间 (RT) 的平

均值如表 3 所示。结果表明，Vanquish Access HPLC 系统具有出色的日内重现性，三组系统适用性溶液的测试结果具有出色的一致性，峰面积的 RSD 为 0.92%，保留时间的 RSD 为 0.19%。

日间重现性通过在三天内进样同一组系统适用性溶液来评估，每组溶液进样 6 次。计算结果如表 3 所示。三天内峰面积的平均 RSD 为 0.77%，三天内保留时间的平均 RSD 为 0.44%，这表明即使在极低的右羟丙哌嗪浓度下 (0.3 µg/mL) 该方法在不同的时间内也表现出相当且一致的性能。这对于确保杂质分析的可靠性和准确性至关重要。

表 2. 右羟丙哌嗪回收率试验结果

样品	样品浓度 (µg/mL)	加标量 (µg/mL)	测得浓度 (µg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD) (%)
低浓度	2.043	1.20	3.25	100.5	107.3	5.56
	2.043		3.37	110.6		
	2.043		3.37	111.0		
中浓度	2.043	10.00	11.49	94.5	97.0	2.33
	2.043		11.93	98.8		
	2.043		11.82	97.8		
高浓度	2.043	33.33	36.37	104.0	101.1	2.68
	2.043		34.60	98.7		
	2.043		35.24	100.6		

表 3. Vanquish Access HPLC 检测右羟丙哌嗪含量的日内和日间性能

参数	日内	日间第 1 天	日间第 2 天	日间第 3 天	日间第 1 天至第 3 天
峰不对称度 (USP)	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
左羟丙哌嗪峰与右羟丙哌嗪峰之间的分离度	4.55	4.60	4.55	4.59	4.58
右羟丙哌嗪的峰面积 (mAU*min) 和 RSD	0.46 RSD% = 0.92	0.46 RSD% = 0.79	0.46 RSD% = 0.44	0.46 RSD% = 0.89	0.46 RSD% = 0.77
右羟丙哌嗪的 RT (min) 和 RSD	10.33 RSD% = 0.19	10.37 RSD% = 0.01	10.30 RSD% = 0.03	10.27 RSD% = 0.09	10.31 RSD% = 0.44

## 样品分析

采用表 1 的色谱条件，对三个不同厂家制造的左羟丙哌嗪胶囊药物进行分析。利用测得的峰面积和标准曲线确定样品中右羟丙哌嗪的含量；结果如表 4 所示。三款左羟丙哌嗪胶囊中右羟丙哌嗪的含量范围为 0.04% 至 0.12%，RSD 低于 0.05%，这表明 Vanquish Access HPLC 系统在复杂样品分析中依然具有出色的表现。

表 4. 检测左羟丙哌嗪胶囊中右羟丙哌嗪的含量

制造商	右羟丙哌嗪含量(%)	RSD (%) (n=3)
01号制造商	0.12	0.02
02号制造商	0.04	0.05
03号制造商	0.09	0.01

## 结论

采用《中国药典（2020年版）》中正相 HPLC 方法，并使用 Vanquish Access HPLC 系统检测了右羟丙哌嗪的含量。该方法的线性范围，准确度和重现性结果表明，Vanquish Access HPLC 系统与 Hypersil Chiral AT 色谱柱的组合在正相 HPLC 分析应用中具备高度可靠且一致的性能。这表明 Vanquish Access HPLC 系统及所选色谱柱适用于按照既定方法准确、精确地检测右羟丙哌嗪。

## 参考文献

1. Shirsat, A.; Trailokya, A.; Wankhede, S. Levodropropizine: A promising peripherallyacting antitussive agent. *IP Indian J. Immunol. Respir. Med.* 2023, 8 (2) 53-61.
2. De Blasio, F.; Dicipinigaitis, P.V.; De Danieli, G.; et al. Efficacy of levodropropizine in pediatric cough. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2012, 25(5), 337-342.
3. Chinese Pharmacopoeia Commission, *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*[S]. Volume 2, 2020:188.



赛默飞  
官方微信



赛默飞色谱  
与质谱中国

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC