中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)12－0085－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.12.019

高效液相色谱法测定盐酸替罗非班原料药中 2 种有关物质

张培生[1]，张　磊[2]，郑　磊[1△]

（1. 山东省立第三医院，山东 济南　250031；　2. 山东省临沂市检验检测中心，山东 临沂　276001）

摘要：目的　建立测定盐酸替罗非班原料药中 2 种有关物质的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 YMC－Pack ODS－AQ C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH 3.0)－乙腈(75∶25，*V*/*V*)，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 227 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。**结果**　杂质 A 及杂质 B 质量浓度分别在 0.76～76.45 μg/mL 和 0.51～50.80 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geqslant 0.999$)，定量限均为 0.1 μg/mL，检测限均为 0.03 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2.0%，平均加样回收率分别为 97.04% 及 95.56%，*RSD* 分别为 2.46% 及 1.64%($n=6$)。**结论**　该方法操作简便、结果准确，精密度、稳定性、重复性、耐用性好，可用于盐酸替罗非班原料药中杂质 A 及杂质 B 的检测。

关键词：盐酸替罗非班；有关物质；高效液相色谱法

Determination of Two Related Substances in Tirofiban Hydrochloride Active Pharmaceutical Ingredient by HPLC

ZHANG Peisheng[1], ZHANG Lei[2], ZHENG Lei[1]

(1. Shandong Provincial Third Hospital, Jinan, Shandong, China 250031; 2. Linyi Inspection and Testing Center, Linyi, Shandong, China 276001)

Abstract: Objective　To establish high－performance liquid chromatography method for simultaneous determination of two related substances in tirofiban hydrochloride active pharmaceutical ingredient. **Methods**　The chromatography column was the YMC－Pack ODS－AQ C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 10 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution (pH 3.0)－acetonitrile (75∶25, *V*/*V*), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 227 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The linear ranges of impurities A and B were 0.76－76.45 μg/mL、0.51－50.80 μg/mL, respectively ($r \geqslant 0.999$). The limit of quantitation was 0.1 μg/mL, the limit of detection was 0.03 μg/mL. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above two components were 97.04% and 95.56%, with *RSD*s of 2.46% and 1.64%($n=6$)男, respectively. **Conclusion**　The established method is easy, accurate and reliable, which can be used to control the quality of two related substances in tirofiban hydrochloride active pharmaceutical ingredient.

Key words: tirofiban hydrochloride; related substance; HPLC

盐酸替罗非班化学名为 *N*－(正丁基磺酰基)－*O*－[4－(4－哌啶基)丁基]－*L*－酪氨酸盐酸盐－水合物，属血小板表面糖蛋白(GPⅡb/Ⅲa)受体的可逆性拮抗剂[1－4]，可阻断血小板交联和聚集，抑制血栓形成，临床多与肝素、阿司匹林等联用，用于治疗急性冠状动脉综合征[5－7]，目前，国内虽已有多家药品生产企业生产上市，但其质量标准并未收载入《中国药典》和国外的各主要药典中。盐酸替罗非班降解生成酪氨酸(杂质 A)和 *N*－丁磺酰基－*L*－酪氨酸(杂质 B)，现已有文献对杂质 B 进行了报告[8－12]，但尚未见关于杂质 A 的报道。高效液相色谱(HPLC)法具有高灵敏度和高分辨率，目前已成为有关物质测定的主要方法[13－16]。本研究中建立了测定盐酸替罗非班中 2 种有关物质的 HPLC 法，以期为制剂的质量标准建立提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

仪器：Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配有二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司)；AE 240 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司，精度为 0.01 mg)；Milli－Q A10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)；ZF－2 型三用紫外仪(上海安亭电子仪器有限公司)；DK－S12 型电热恒温水浴锅(上海森信仪器公司)。

试药：盐酸替罗非班对照品(批号为 100646－202104，含量 96.1%)，杂质 A 对照品(批号为 140609－202215，含量 99.9%)，均购自中国食品药品检定研究院；杂质 B 对照品(批号为 2302001，含量 98.96%)，盐酸替罗非班原料药(批号分别为 240101A、240102A、231101A)，均购自鲁南贝特制药有限公司；乙腈为色谱纯，磷酸为优级纯，水为超纯水。

第一作者：张培生，男，大学本科，药师，研究方向为药事管理，(电子信箱)15192063860@163.com。

△**通信作者：**郑磊，男，硕士研究生，副主任药师，研究方向为临床药学与药物分析，(电子信箱)zhenglei8501@163.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：YMC - Pack ODS - AQ C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：10 mmol / L磷酸二氢钾溶液（用磷酸调pH至3.0）- 乙腈（75∶25，*V* / *V*）；流速：1.0 mL / min；检测波长：227 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。检测器为蒸发光散射检测器。

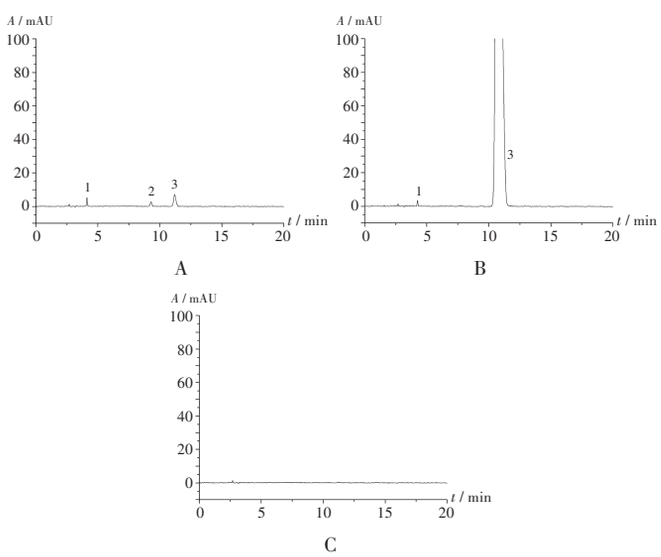
2.2 溶液制备

取盐酸替罗非班对照品21.78 mg、杂质A对照品15.31 mg、杂质B对照品10.27 mg，精密称定，分别置10 mL容量瓶中，用流动相溶解并定容，摇匀，制得质量浓度分别为2.093，1.529，1.016 mg / mL的单一对照品溶液。精密量取1 mL，置100 mL容量瓶中，用流动相定容，摇匀，制得质量浓度分别为20.93，15.29，10.16 μg / mL的混合对照品溶液。取样品约100 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，用流动相溶解并定容，经0.2 μm滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。以流动相为空白对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验：取上述对照品溶液、供试品溶液、空白对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱。结果盐酸替罗非班主成分与2种待测杂质色谱峰之间的分离度均大于2.5，基线分离良好。在空白对照品色谱图中无其他色谱峰；色谱峰的峰形对称，拖尾因子均为0.8～1.5。详见图1。

专属性考察：取样品100 mg，精密称定，各5份，置100 mL容量瓶中。1）酸降解试验。加入1 mol / L盐酸溶液1 mL，于60 ℃水浴中加热进行强酸降解，2 h后加入1 mol / L氢氧化钠溶液1 mL，用流动相定容。2）碱降解试验。1份加入1 mol / L氢氧化钠溶液1 mL，于60 ℃水浴中加热进行强碱降解，2 h后加入1 mol / L盐酸溶液1 mL，用流动相定容。3）氧化降解试验。加入30%过氧化氢溶液1 mL，于60 ℃水浴中加热进行氧化降解，20 min后用流动相定容。4）高温降解试验。用流动相溶解样品，于90 ℃水浴中持续加热3 h。5）光照降解试验。用流动相溶解样品后，倒入石英吸收皿中，于245 nm波长下10 cm处照射5 h。结果在酸降解和碱降解条件下，并未生成杂质B，而杂质A的含量显著增加；在氧化降解条件下，杂质A和杂质B含量均显著增加，且同时有多种未知杂质生成；在高温降解和光照降解条件下，样品中的杂质含量均未显著增加。说明样品在氧化破坏条件下不稳定，降解生成多种杂质，样品对高温和光照条件非常稳定。生成的各杂质峰之间的分离度均大于1.5，对2种待测杂质的检测无干扰。详见图2。



1. 杂质A 2. 杂质B 3. 盐酸替罗非班

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白对照品溶液

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Impurity A 2. Impurity B 3. Tirofiban hydrochloride

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Blank reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of system suitability test

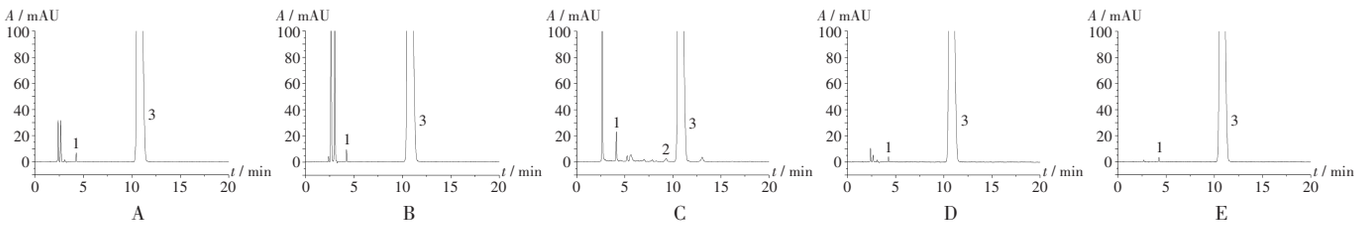
线性关系考察：分别精密量取杂质A及杂质B对照品贮备溶液0.05，0.10，0.25，0.50，1.00，2.00，5.00 mL，置100 mL容量瓶中，加流动相定容，摇匀，制成系列对照品溶液。精密量取10 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度（*X*，μg / mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程，杂质A为$Y_1 = 27.21X_1 - 8.03$（$r = 0.999$）、杂质B为$Y_2 = 39.61X_2 - 4.82$（$r = 1.000$）。结果表明，杂质A及杂质B质量浓度分别在0.76～76.45 μg / mL和0.51～50.80 μg / mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察：分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量，倍比稀释，并按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比10∶1和3∶1时的进样量分别记作定量限、检测限。结果2种杂质定量限均为0.1 μg / mL，检测限均为0.03 μg / mL。

精密度试验：取2.2项下混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果，杂质A及杂质B峰面积的*RSD*分别为0.93%和0.95%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液（批号为240101A）适量，分别于室温下放置0，4，8，12，24 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果杂质A峰面积的*RSD*为1.13%（$n = 5$），表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验：称取样品（批号为240101A）适量，精密称定，各6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果杂质A含量的*RSD*为1.22%（$n = 6$），表明方法重复性良好。



1. 杂质A　2. 杂质B　3. 盐酸替罗非班

A. 酸降解　B. 碱降解　C. 氧化降解　D. 高温降解　E. 光照降解

图3　专属性试验高效液相色谱图

1. Impurity A　2. Impurity B　3. Tirofiban hydrochloride

A. Acid degrade　B. Alkaline degrade　C. Oxygen degrade　D. Heat degrade　E. Light degrade

Fig. 2　Chromatograms of destructive test

加样回收试验：取已知含量样品（批号为240101A）适量，共6份，分别加入杂质A及杂质B对照品溶液，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，计算回收率。结果见表1。

表1　加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 1　Results of the recovery test（$n=6$）

待测成分	取样量(mg)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	RSD(%)
杂质A	50.72	77.09	76.45	150.52	96.05		
	50.85	77.29	76.45	153.60	99.82		
	50.62	76.94	76.45	150.34	96.01	97.04	2.46
	50.71	77.08	76.45	153.19	99.56		
	50.29	76.44	76.45	150.81	97.28		
	50.37	76.56	76.45	148.07	93.54		
杂质B	50.72	0.00	50.80	49.36	97.17		
	50.85	0.00	50.80	48.04	94.57		
	50.62	0.00	50.80	49.22	96.89	95.56	1.64
	50.71	0.00	50.80	47.57	93.64		
	50.29	0.00	50.80	49.18	96.81		
	50.37	0.00	50.80	47.89	94.27		

2.4　样品含量测定

取3批样品各适量，分别按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下色谱条件进样测定，平行测定3次，记录峰面积并计算样品含量。结果见表2。

表2　样品含量测定结果（mg/g，$n=3$）

Tab. 2　Results of content determination of samples（mg / g，$n=3$）

批号	杂质A	杂质B
240101A	1.52	未检出
240102A	1.47	未检出
231101A	1.63	未检出

3　讨论

3.1　流动相选择

预试验中流动相分别设为0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液（pH 2.3）－乙腈（等度洗脱）、0.025 mol/L磷酸二氢钾溶液（pH 6.5）－乙腈（梯度洗脱）和0.1%醋酸铵－乙腈－甲醇（梯度洗脱），结果后两种色谱条件分析时间较长，不利于2种杂质的检测。采用0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液（pH 2.3）－乙腈作为流动相时，杂质A出峰较快，在专属性试验考察时，其降解产物存在干扰。且pH为2.3时，降解产物色谱峰存在拖尾现象。预试验中在该色谱条件基础上对pH和流动相比例进行了优化，通过减少流动相中乙腈的比例，使杂质A色谱峰保留时间延后，消除了其他降解产物峰的干扰。将流动相pH调至3.0后，各杂质峰均能保持较好的峰形，消除拖尾现象。

3.2　检测波长选择

本研究中采用高效液相色谱仪配备的二极管阵列检测器对盐酸替罗非班和2种待测杂质的紫外吸收光谱进行分析，选择3种成分共同的最大吸收波长227 nm作为检测波长。

3.3　方法评价

盐酸替罗非班为心内科常用急救药物，但对其有关物质的报道较少，其中存在的多种工艺杂质和降解杂质尚未见报道，其质量控制存在较大的安全风险。本研究中建立的HPLC法对盐酸替罗非班原料药中2种杂质进行检测，结果表明该方法操作简便、准确，精密度、稳定性、重复性、耐用性好，可用于盐酸替罗非班原料药中杂质A及杂质B的检测。

参考文献

[1] 孙彦利. 盐酸替罗非班对急性心肌梗死冠脉介入治疗患者心功能及炎性因子的影响[J]. 中国实用医药，2023，18(2)：96－99.

[2] 张　宁，刘　静，崔　涛，等. 替罗非班用于急性前循环大血管闭塞机械取栓术效果及预后影响因素分析[J]. 中国药业，2024，33(12)：88－92.

[3] 张　曼，张　盈，张义辉，等. 替罗非班治疗急性脑梗死阿替普酶溶栓后再闭塞患者预后及其影响因素分析[J]. 中国药业，2024，33(15)：52－56.

[4] 黄　毅，陈文广，崔　跃，等. 盐酸替罗非班联合氯吡格雷治疗行经皮冠状动脉介入急性非ST段抬高型心肌梗死临床评价[J]. 中国药业，2019，28(12)：60－62.