

HPLC法测定盐酸甲氧氯普胺注射液的含量及有关物质*

田兰, 赵秀红, 封淑华, 郭毅, 刘红莉, 曹凤习

(河北省药品检验所, 石家庄 050011)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定盐酸甲氧氯普胺注射液的含量和有关物质。方法: 采用 C_{18} 色谱柱 (4.0 mm × 250 mm, 5 μ m); 以乙腈 - 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 至 4.0) (19: 81) 为流动相; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 275 nm。结果: 在建立的色谱条件下, 甲氧氯普胺与杂质能完全分离; 甲氧氯普胺浓度在 12.4~124.0 μ g·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, $r=1.000$, 平均回收率为 99.3% ($n=9$); 测定甲氧氯普胺的最小检出量为 0.3 ng。结论: 本方法简便、准确, 灵敏度高, 专属性强, 可用于盐酸甲氧氯普胺注射液的质量控制。

关键词: 盐酸甲氧氯普胺注射液; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-1031-05

HPLC determination of metoclopramide dihydrochloride injection content and its related substances*

TIAN Lan, ZHAO Xiu-hong, FENG Shu-hua, GUO Yi, LIU Hong-li, CAO Feng-xi

(Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of content and related substances for metoclopramide dihydrochloride injection. **Methods** C_{18} column (4.0 mm × 250 mm, 5 μ m) was adopted with the mobile phase of acetonitrile - 0.02 mol·L⁻¹ phosphoric acid solution (adjusting pH to 4.0 with triethylamine) (19: 81). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 275 nm. **Results** Under the described chromatographic condition, metoclopramide was completely separated from its impurities. A linearity between peak area and metoclopramide concentration was achieved in the range of 12.4 - 124.0 μ g·mL⁻¹, with r of 1.000. The average recovery ($n=9$) was 99.3%. The lowest detectable amount was 0.3 ng. **Conclusion** The method is convenient, accurate, specific and sensitive and can be used for quality control of Metoclopramide Dihydrochloride Injection.

Key words metoclopramide dihydrochloride injection, content, related substances, HPLC

甲氧氯普胺, 又称胃复安、灭吐灵, 为有机合成的普鲁卡因酰胺衍生物。具有中枢性镇吐作用、外周性镇吐作用及一定的催乳作用。盐酸甲氧氯普胺注射液的标准收载于中国药典 2005 年版二部中^[1], 含量测定方法为紫外分光光度法, 无有关物质检查项目。BP2007 版^[2]采用 HPLC 法测定甲氧氯普胺注射液的有关物质, 在其色谱条件下, 可检出 2 个杂质, 但主成分峰与杂质峰的分离不够理想。国内的有关文献, 也均为甲氧氯普胺的含量测定^[3, 4], 未见同时测定有关物质的报道。本文采用 HPLC 法, 同

时测定盐酸甲氧氯普胺注射液的含量和有关物质, 可有效检出 5 个杂质。方法简便、准确, 专属性强, 灵敏度高, 重现性好, 可用于盐酸甲氧氯普胺注射液的质量控制。

1 仪器与试剂

岛津 LC-2010A HT 型高效液相色谱仪, 岛津 LC-2010C HT 型高效液相色谱仪, Agilent-1100 型高效液相色谱仪 (二极管阵列检测器)。色谱柱: Diamonsil C_{18} (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m), Agela C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 岛津 VP-ODS (4.6 mm × 150

* 河北省科技攻关课题 (课题编号 07276426)

第一作者 Tel: (0311) 85212004-8038 E-mail: tianlan921@sina.com

mm, 5 μm)。Millipore 超纯水仪, sartorius BP211D 电子天平。甲氧氯普胺对照品(由中国药品生物制品检定所提供), 甲氧氯普胺原料(由生产厂家提供), 盐酸甲氧氯普胺注射液(由生产厂家提供, 规格 1 mL: 10 mg)。乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 磷酸、三乙胺、盐酸、氢氧化钠及过氧化氢均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

采用岛津 LC-2010A HT 型高效液相色谱仪, 色谱柱: Age la C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 - 0.02 mol \cdot L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节

pH 至 4.0) (19: 81), 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长: 275 nm, 进样量: 20 μL 。

取本品适量, 用流动相稀释制成每 1 mL 中约含甲氧氯普胺 0.20 mg 的供试品溶液, 量取 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 理论板数按甲氧氯普胺峰计算应不低于 2000, 甲氧氯普胺峰与相邻杂质峰的分度应符合要求。

2.2 专属性试验

2.2.1 阴性试验 按处方量配制空白供试品, 按“2.6”项下方法配制阴性样品溶液, 精密量取 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图 (见图 1)。

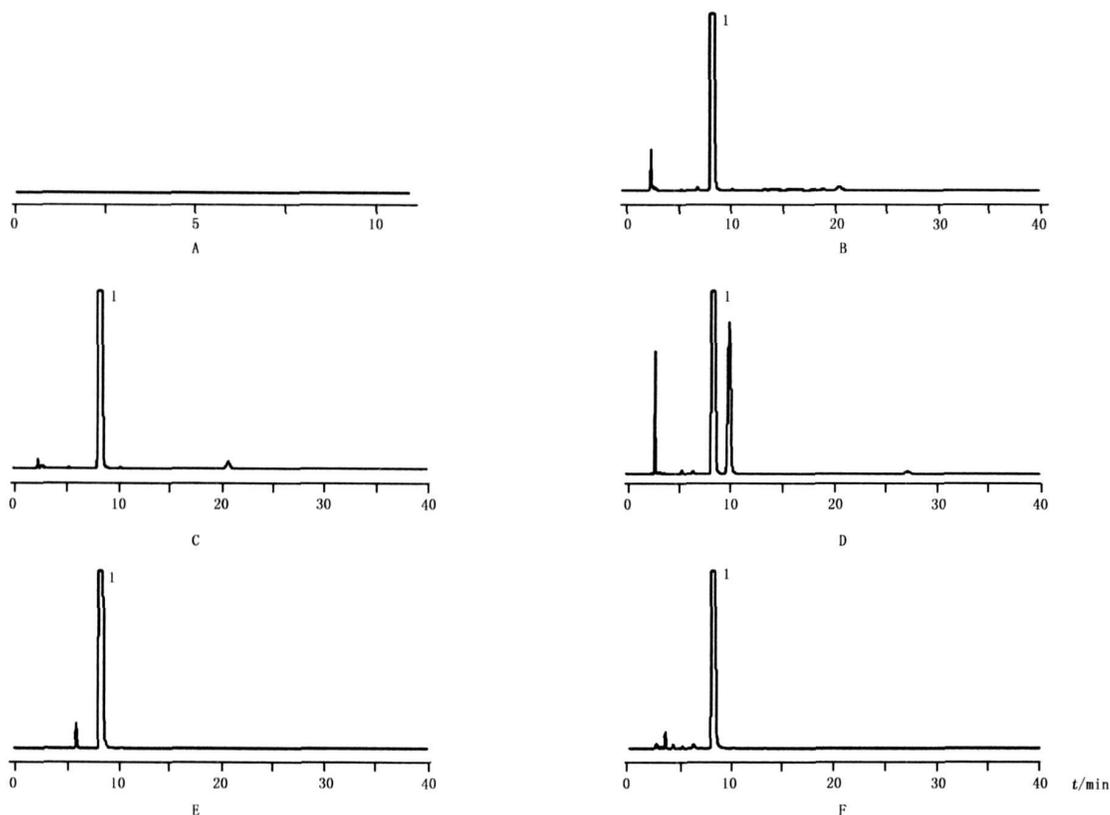


图 1 甲氧氯普胺的专属性试验色谱图

Fig 1 Chromatograms of specificity test

A. 阴性样品溶液 (negative sample without metoclopramide) B. 强酸破坏 (decomposed by 6 mol \cdot L⁻¹ hydrochloric acid) C. 强碱破坏 (decomposed by 2 mol \cdot L⁻¹ sodium hydroxide solution) D. 氧化破坏 (decomposed by 3% hydrogen peroxide solution) E. 高温破坏 (decomposed by heating at about 130 $^{\circ}\text{C}$) F. 光照破坏 (decomposed by strong light irradiation)

1. 甲氧氯普胺 (metoclopramide)

2.2.2 酸破坏 精密称取甲氧氯普胺原料适量, 加 6 mol \cdot L⁻¹ 盐酸 2 mL, 置水浴上加热 1 h, 放冷, 加 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液调至中性, 加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 1.0 mg 的溶液。

2.2.3 碱破坏 精密称取甲氧氯普胺原料适量, 加 2 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 置水浴上加热 10

min 放冷, 加 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸调至中性, 加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 1.0 mg 的溶液。

2.2.4 氧化破坏 精密称取甲氧氯普胺原料适量, 加 3% 过氧化氢溶液 2 mL 溶解后, 加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 1.0 mg 的溶液。

2.2.5 高温破坏 取甲氧氯普胺原料,置 130 ℃烤箱中加热 5 h 放冷,精密称定适量,加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 1.0 mg 的溶液。

2.2.6 强光破坏 取甲氧氯普胺原料,置照度为 4000 k 的灯光下照射 48 h,精密称取适量,加流动相定量稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 1.0 mg 的溶液。

2.2.7 破坏试验结果 精密量取上述各破坏溶液 5 μL,照“2.1”项下的色谱条件进行降解产物检出试验,结果表明:经酸、碱、氧化、高温、光照条件破坏的供试品溶液的色谱图中均有不同程度的杂质峰产生,且均与主成分峰分离良好,即本色谱条件满足有关物质检查的系统适用要求,色谱图见图 1。

2.3 线性规律考察 由于本品的杂质对照品不易获得,在假设主成分与各杂质的响应因子均相同的前提下,考察杂质在自身对照溶液浓度附近变化时的线性规律。取甲氧氯普胺对照品适量,加 0.1 mol·mL⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 溶解并用流动相稀释制成含甲氧氯普胺 0.096~7.68 μg·mL⁻¹ 的 7 个浓度的溶液,照“2.1”项下的色谱条件进行测定,以峰面积 Y 对浓度 X (μg·mL⁻¹) 作线性回归,结果峰面积与样品自身对照溶液的浓度呈良好的线性关系:

$$Y = 5.627 \times 10^4 X + 3.703 \times 10^2 \quad r = 1.0000$$

表明杂质在 0.096~7.68 μg·mL⁻¹ (杂质限量在 0.05%~4.0% 范围内) 浓度范围内变化时,用

自身对照溶液进行定量,能够得到较为准确的结果。

2.4 最小检出量、定量限、峰纯度检查及稳定性试验

取甲氧氯普胺对照品适量,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 2 mL 溶解并用流动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 15.11 ng 的溶液,精密量取 20 μL,照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,结果 S/N = 3 则最小检出量为 0.3 ng

取甲氧氯普胺对照品适量,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 2 mL 溶解并用流动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 70.02 ng 的溶液,精密量取 20 μL,照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,结果 S/N = 10 定量限即为 1.4 ng

分别取“2.2”项下 5 种破坏溶液各 5 μL,注入高效液相色谱仪,经二极管阵列检测器检测,主成分峰的峰纯度为 999.997,表明主成分峰未包含其他杂质峰。

取供试品溶液室温下放置,在上述色谱条件下,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定,结果显示供试品溶液的主成分峰及各杂质峰的峰面积基本一致,说明溶液在 24 h 内稳定, RSD 为 0.45% (n = 6)。

2.5 系统耐用性试验

采用不同品牌的色谱柱以及不同型号的高效液相色谱仪,照“2.1”项下的色谱条件,取“2.6”项下的供试品溶液,测定杂质总量。结果见表 1 表 2。

表 1 不同色谱柱的系统耐用性试验结果

Tab 1 System ruggedness test of different columns

色谱柱 (solid phase)	相对保留时间 (relative retention time)	杂质总量 (total impurities) %
Diamonsil C ₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm)	0.61 0.75 0.91 1.25 1.57	0.63
Agela C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	0.55 0.63 0.74 1.22 1.47	0.74
SH MADZU VP- ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)	0.54 0.57 0.76 1.20 1.30	0.66

表 2 不同液相色谱仪的系统耐用性试验结果

Tab 2 System ruggedness test of different instruments

高效液相色谱仪 (instrument)	相对保留时间 (relative retention time)	杂质总量 (total impurities) %
SH MADZU LC- 2010A HT	0.54 0.57 0.76 1.20 1.30	0.66
SH MADZU LC- 2010C HT	0.55 0.60 0.77 1.22 1.35	0.64

结果表明,不同品牌规格的色谱柱及不同型号的高效液相色谱仪检测结果基本一致,重现性良好,说明本方法具有良好的耐用性。

2.6 有关物质测定 取 6 个生产厂家的样品,用流

动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 0.20 mg 的溶液,作为供试品溶液;精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液,取 20 μL 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的 20%;再精密量取对照溶液和供试品溶液各 20 μL,照“2.1”项下的色谱条件,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍。按主成分自身对照法以峰面积计算杂质的量。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,各杂质峰面积的和不得大于对照溶液的主峰面积 (1.0%)。结果见图 2 表 3。

表 3 样品测定结果 (%)
Tab 3 Determination result of samples

来源 (sources)	批号 (Lot No)	最大单一杂质质量 (maximum impurity)	杂质总量 (total impurities)	含量 (content)	RSD /%
无锡第七制药有限公司 (Wuxi No. 7 Pharmaceutical Co., Ltd.)	04022313	0.07	0.30	100.05	0.09
上海禾丰制药有限公司 (Shanghai Harvest Pharmaceutical Co., Ltd.)	070103	0.06	0.27	99.76	0.09
郑州羚锐制药有限公司 (Zhengzhou Lingrui Pharmaceutical Co., Ltd.)	0701111	0.18	0.67	93.58	0.12
山东天福制药厂 (Shandong Tianfu Pharmaceutical Factory)	0611091	0.11	0.35	95.79	0.08
天津药业集团新郑股份有限公司 (Tianjin Pharmaceutical Group Xinzheng Co., Ltd.)	0504071	0.21	0.62	96.53	0.06
江苏鹏鹞药业有限公司 (Jiangsu Pengyao Pharmaceutical Co., Ltd.)	0608141	0.27	0.93	95.79	0.10

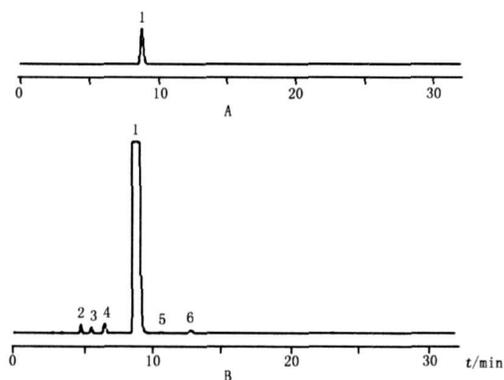


图 2 有关物质色谱图

Fig 2 Chromatograms of related substances

A. 对照 (reference) B. 样品 (sample)

1. 甲氧氯普胺 (metoclopramide) 2~6. 杂质 (impurities)

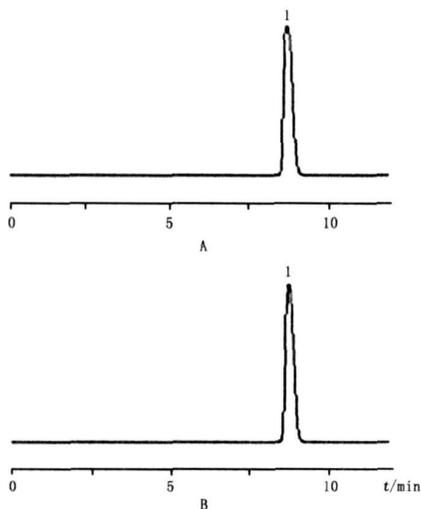


图 3 甲氧氯普胺对照品 (A) 及样品 (B) 色谱图

Fig 3 Chromatograms of metoclopramide reference substance (A) and sample (B)

1. 甲氧氯普胺 (metoclopramide)

2.7 线性试验 取甲氧氯普胺对照品适量, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 2 mL 溶解并用流动相稀释制成含甲氧氯普胺 $12.4 \sim 124.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5 个浓度的溶

液, 照“2.1”项下的色谱条件进样 $20 \mu\text{L}$, 记录色谱图, 以峰面积 Y 对浓度 $X (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 进行线性回归, 结果表明, 在 $12.4 \sim 124.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 测得的峰面积与甲氧氯普胺的浓度呈良好的线性关系, 线性方程为:

$$Y = 5.279 \times 10^4 X + 2.715 \times 10^4 \quad r = 1.0000$$

2.8 精密性、重现性及溶液的稳定性试验

取甲氧氯普胺对照品适量, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 2 mL 溶解并用流动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 $62 \mu\text{g}$ 的溶液, 分别连续进样 6 次, 记录色谱图, 以峰面积计算 $\text{RSD} (n = 6)$ 为 0.79% 。

取上海乐丰制药有限公司批号为 070103 的样品, 照“2.10”项下的方法配制 6 份供试品溶液, 取 $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算样品的含量分别为 99.78% , 99.06% , 99.79% , 100.85% , 99.32% , 99.75% ; $\text{RSD} (n = 6)$ 为 0.69% 。

取供试品溶液室温下放置, 在上述色谱条件下, 分别于 $0, 2, 8, 12, 18, 24 \text{ h}$ 进行测定, 以峰面积计算 $\text{RSD} (n = 6)$ 为 0.51% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验 精密量取已知含量的同一批号的样品 1 mL , 置 50 mL 量瓶中, 共取 9 份, 分成 3 组 (每组各 3 份), 每组分别加入浓度为 $1.54 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲氧氯普胺溶液, 照“2.10”项下的方法, 制成 9 份供试品溶液, 使主成分浓度分别为标示量的 80% , 100% , 120% , 每个浓度各 3 份。分别取 $20 \mu\text{L}$ 进样。另取甲氧氯普胺对照品, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 2 mL 溶解, 加流动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 $62 \mu\text{g}$ 的对照品溶液, 同法测定, 记录色谱图, 按外标法计算。结果低、中、高 3 个浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 99.3% , 99.2% , 99.3% ; RSD 分别为 0.53% , 0.65% , 0.36% 。平均回收率 ($n = 9$) 为

99.3%, RSD为 0.46%。

2.10 含量测定 取 6 个生产厂家的样品各 20 支混匀,精密量取 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,取 20 μ L,照“2.1”项下的色谱条件注入液相色谱仪,记录色谱图;另取甲氧氯普胺对照品适量,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL 溶解,加流动相稀释制成每 1 mL 中含甲氧氯普胺 62 μ g 的对照品溶液,同法测定。按外标法以峰面积计算含量。结果见图 3 表 3。

3 讨论

3.1 流动相的选择 分别考察了甲醇-乙腈-醋酸盐缓冲液 (pH 3.8) (7:15:78), 甲醇-乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 分别至 3.0 4.0 5.0) (7:15:78), 甲醇-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 至 4.0) (27:73), 乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 至 4.0) (19:81), 结果发现乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 磷酸溶液 (用三乙胺调节 pH 至 4.0) (19:81), 保留时间适宜,主峰的峰形良好,与各杂质分离良好。

3.2 检测波长的选择 取“专属性试验”中破坏试验项下的酸破坏溶液、碱破坏溶液、氧化破坏溶液、高温破坏溶液、强光破坏溶液,分别注入液相色谱仪,采用二极管阵列检测器检测,得到主成分甲氧氯普胺及各杂质的紫外吸收图谱。图谱表明,甲氧氯普胺及各杂质,在 275 nm 与 214 nm 波长处大多有最大吸收或强吸收。因此将检测波长为 275 nm 与 214 nm 的液相色谱图进行比较,结果表明,在不同的检测波长下,杂质的种类及杂质质量的多少基本一致,由于检测波长在 214 nm 时,液相色谱图的基线不平稳,波动较大,可增大测定误差,使测定结果不准确。因此,确定本方法的检测波长为 275 nm。

3.3 在有关物质测定中,测定的 6 批样品均出现 5

个杂质,相对保留时间分别为 0.54 0.63 0.74 1.22 1.47。而在破坏试验中,酸破坏产生 4 个杂质,相对保留时间分别为 0.63, 0.83, 1.24, 2.59; 碱破坏产生 3 个杂质,相对保留时间分别为 0.63, 1.25, 2.52; 氧化破坏产生 4 个杂质,相对保留时间分别为 0.63, 0.76, 1.19, 3.37; 高温破坏产生 3 个杂质,相对保留时间分别为 0.63, 0.71, 1.25; 强光破坏产生 4 个杂质,相对保留时间分别为 0.42, 0.52, 0.76, 1.14。把样品中的杂质与破坏试验中出现的杂质相比较,并经过二极管阵列检测器检测,可初步确定,杂质 1(相对保留时间为 0.54)与强光破坏中相对保留时间为 0.52 的杂质相同; 杂质 2(相对保留时间为 0.63)与酸、碱、氧化、高温破坏中相对保留时间为 0.63 的杂质相同; 杂质 3(相对保留时间为 0.74)与氧化破坏中相对保留时间为 0.76 的杂质相同; 杂质 4(相对保留时间为 1.22)与酸、碱、高温破坏中相对保留时间为 1.24(1.25)的杂质相同; 杂质 5(相对保留时间为 1.47)未找到来源,需进一步试验进行确定。由此可见,样品中的 5 个杂质有 4 个可以与破坏试验相对应,说明破坏试验条件选择比较合适,基本达到破坏试验的目的。

参考文献

- 1 ChP(中国药典) 2005. Vol II (二部): 120
- 2 BP 2007. 2750
- 3 CHEN Jun(陈均), JIANG Wen-ming(江文明), JIANG Xin-guo(蒋新国), *et al* Determination of metoclopramide nasal spray by HPLC(甲氧氯普胺鼻腔喷雾剂的 HPLC 测定). *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2004, 35(1): 41
- 4 WANG Lin(王琳), CHENG Gang(程刚), ZOU Mei-juan(邹梅娟), *et al* RP-HPLC determination of metoclopramide in plasma of dogs(反相高效液相色谱法测定家犬体内甲氧氯普胺的血药浓度). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(4): 432

(本文于 2008 年 5 月 13 日收到)