

## 盐酸罂粟碱注射液含量测定及有关物质研究

王瑶, 陆益红\*, 孟长虹, 张玫, 谭力, 金卫红, 黄青, 李晶晶

(江苏省食品药品检验所, 南京 210008)

**摘要** 目的: 针对盐酸罂粟碱注射液现行标准中采用非水滴定进行含量测定且未对注射液中有关物质进行控制, 建立了一种同时测定含量和有关物质的 HPLC 方法, 并对注射液中存在的杂质用 HPLC-MS 联用技术进行结构推断。方法: 采用  $C_{18}$  色谱柱 (SepaxGP 250 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu$ m), 以 0.005 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠的 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (以磷酸调 pH 至 3.0) - 甲醇 (50:50) 为流动相, 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm。结果: 在本文色谱条件下, 主峰和杂质峰能得到良好的分离; 盐酸罂粟碱浓度在 0.5 ~ 150  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 范围内与峰面积呈良好线性关系  $r = 0.9997$ ; 平均回收率 ( $n = 9$ ) 为 101.7%。用 HPLC-MS 对注射液中杂质分析的结果表明: 注射液的杂质为光氧化产物, 它可能是注射液颜色变深的原因之一。结论: 该法专属性强, 灵敏、准确, 耐用性好, 可作为盐酸罂粟碱注射液的质量控制方法。

**关键词:** 盐酸罂粟碱注射液; 含量测定; 杂质; 罂粟醇; 高效液相色谱法; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1693-06

## Study on determination of papaverine hydrochloride injection and its related substances

WANG Yao, LU Yi-hong\*, MENG Chang-hong, ZHANG Mei, TAN Li, JIN Wei-hong, HUANG Qing, LI Jing-jing

(Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the determination of papaverine hydrochloride injection and its related substances. **Methods:** The separation was performed on a  $C_{18}$  column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) with a mixture of 0.005 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> heptane sulfonate sodium in 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) - methanol (50:50) as the mobile phase; The flow rate was 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, and the UV detection wavelength was 254 nm. Liquid chromatographic method coupled with electrospray ionization - mass spectrometry (LC-MS) was also used to identify the related substances. **Results:** The new method showed good resolution and a linearity between peak area and papaverine hydrochloride concentration was achieved in the range of 0.5 - 150  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> with  $r = 0.9997$ ; The average recoveries ( $n = 9$ ) was 101.7%. The impurity in injection may be from photooxidation products according to LC-MS. **Conclusion:** The method is proved to be specific, sensitive and accurate, and can be used to control the quality of papaverine hydrochloride injection.

**Key words:** papaverine hydrochloride injection; assay; impurity; papaverinol; HPLC; LC-MS

罂粟碱 (1-(3,4-二甲氧基苄基)-6,7-二甲氧基异喹啉) 是自然界中存在的一种苄基异喹啉类生物碱, 在阿片类植物如罂粟的壳和籽中含量较高。目前临床使用的均为人工合成产品, 一般是以盐酸盐的形式进行肌内和静脉注射, 或是口服给药<sup>[1]</sup>。由于该化合物具有抗痉挛作用和对血管、心脏或其他平滑肌的直接非特异性松弛作

用, 罂粟碱被广泛地应用于脑、心和外周血管痉挛引起的缺血以及肾、胆和胃肠道等内脏痉挛的临床治疗中。

中国药典 2005 年版二部收载有盐酸罂粟碱注射液和片剂, 其含量测定均采用非水滴定法, 操作烦琐, 试剂对环境 and 操作人员有污染和毒害。本文参考文献 [2, 3], 建立了同时测定盐酸罂粟碱含量和

\* 通讯作者 Tel: (025) 86633622; E-mail: yihonglu@163.com

有关物质的高效液相色谱法,该法专属性强,灵敏、准确,耐用性好,可作为盐酸罂粟碱注射液的质量控制方法。同时对样品的颜色和有关物质的量进行了相关性研究,建立了 LC-MS 法对有关物质的结构进行推测和鉴定,其主要杂质可能为光氧化产物罂粟醇(见图 1)<sup>[4]</sup>。提出在注射液处方中加入稳定剂可以降低有关物质的含量并防止样品颜色变深。

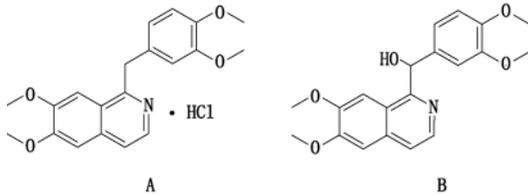


图 1 盐酸罂粟碱及有关物质的结构式

Fig 1 Structures of papaverine hydrochloride and related substance

A. 盐酸罂粟碱(papaverine hydrochloride) B. 罂粟醇(papaverinol)

表 1 盐酸罂粟碱注射液各企业处方组成

Tab 1 The formulations of papaverine hydrochloride injection in different manufacturers

厂家 (manufacturer)	盐酸罂粟碱 (papaverine hydrochloride)	乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)	注射级活性炭 (active carbon for injection)	水 (water)	支 (to make ampoules)
A	30 g	—	—	100 mL	100
B	30 g	0.05 g	—	100 mL	100
C	30 g	0.06 g	0.3 g	100 mL	100

甲醇(50:50);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:254 nm;进样量:20 μL。理论塔板数按盐酸罂粟碱计算大于 2000。

### 3 方法与结果

**3.1 专属性考察** 取原料药适量,共 6 份,分别加处方量的空白辅料,分别经强酸沸水浴(1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸)、强碱沸水浴(8 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化钠溶液)、30%过氧化氢溶液沸水浴、光照(24 h)、加热及光照(10 d)破坏处理,中和后,分别用流动相溶解并稀释成每 1 mL 中约含 2 mg 的溶液,取 20 μL 进行 HPLC 分离分析。结果表明:在上述色谱条件下各种破坏后的降解产物与主峰完全分离,空白辅料也不干扰样品的测定,其中氧化破坏样品色谱图见图 2。

**3.2 线性关系考察** 取盐酸罂粟碱对照品适量,精密称定,用流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中分别含盐酸罂粟碱 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 μg 的对照品溶液,每浓度配制 3 份,分别精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,每份溶液进样 3 次,取峰面积(A)的平均值作为纵坐标,浓度(C)作为横坐标,进行线性回归,回归方程为:

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪:二极管阵列检测器,ALS 自动进样器,二元泵;Waters 2695 高效液相色谱仪:2996 PAD 检测器,自动进样器,二元泵。Agilent 1100 系列 LC/MSD Trap 液质联用仪。

盐酸罂粟碱对照品由中国药品生物制品检定所提供,批号 171214-200404;盐酸罂粟碱注射液,规格为 1 mL:30 mg,由 3 个厂家提供共 6 批样品,产品处方见表 1;原料药由厂家提供。甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

### 2 色谱条件

色谱柱:Sepax GP C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.005 mol·L<sup>-1</sup>庚烷磺酸钠的 0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液(以磷酸调 pH 至 3.0) -

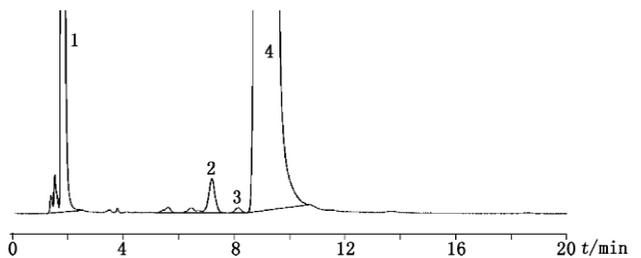


图 2 氧化破坏样品色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of sample destroyed by oxidation

1. 溶剂(solvent) 2, 3. 杂质(impurity) 4. 罂粟碱(papaverine)

$$Y = 168.4X + 55.36 \quad r = 0.9997$$

结果表明进样浓度在 0.5~150 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内,与罂粟碱色谱峰面积呈良好线性关系。

**3.3 定量限、检测限测定** 取对照品适量,加流动相制成一定浓度的盐酸罂粟碱溶液,照“2”项下色谱条件进样,记录色谱图,检测限为 0.25 ng(3 倍信噪比),定量限为 1 ng(10 倍信噪比)。

**3.4 重复性试验** 分别取同批样品 6 份,按“3.9”项下方法以流动相配制成浓度为 60 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液,精密量取 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,以外标法计算含量,结果表明重复性良好,RSD 为 0.6%。

**3.5 中间精密度** 选择 1 批样品( PH080101) ,用 2 台液相色谱仪( Waters 2695 和 Agilent 1100) 3 根色谱柱: SepaxGP C<sub>18</sub>柱、岛津 ODS C<sub>18</sub>及 Waters Sun-Fire C<sub>18</sub>柱 测定盐酸罂粟碱的含量 ,结果均无显著性差异。

**3.6 回收率试验** 取已知含量的盐酸罂粟碱原料及空白辅料 ,按处方比例制备含主药 80% ,100% , 120% 的模拟样品进行 HPLC 测定 ,确定盐酸罂粟碱 HPLC 测定的准确度( 回收率) 和精密度。结果平均回收率( *n* =9) 为 101. 7% ,见表 2。

表 2 回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery test

加入量( added) /g	测得量( found) /g	回收率( recovery) /%	平均回收率( average recovery) /%	RSD /%
481. 37	486. 42	101. 0	101. 7	1. 2
475. 49	480. 34	101. 0		
478. 35	493. 36	103. 1		
599. 19	608. 56	101. 6	101. 8	0. 64
598. 55	606. 13	101. 3		
597. 86	612. 84	102. 5		
720. 66	728. 74	101. 1	101. 7	0. 61
722. 85	739. 97	102. 4		
724. 01	736. 31	101. 7		

**3.7 稳定性考察** 取“3. 9”项下供试品溶液( 60 μg · mL<sup>-1</sup>) ,分别于 0 ,1 ,2 ,4 ,8 ,12 ,24 h 进样测定。结果表明 ,供试品溶液在 24 h 内稳定 ,峰面积的 RSD 为 0. 34% 。

大杂质对测定结果的影响。结果表明不同色谱柱辅料峰、最大杂质峰与主成分峰的比值恒定 ,并确定与主峰相对保留时间为 0. 3 以前的峰为辅料峰 ,主成分峰与杂质峰分离度均良好 ,最大杂质的相对保留时间较为一致 ,在 0. 79 ~0. 83 之间。结果见表 3。

**3.8 方法耐用性** 本文考察了不同型号 C<sub>18</sub> 色谱柱在不同流动相比例和不同流速条件下 ,辅料和最

表 3 不同型号 C<sub>18</sub> 色谱柱系统适用性测定结果比较

Tab 3 System suitability comparison of determination between different C<sub>18</sub> HPLC columns

色谱柱 ( column)	流动相比例 ( ratio of mobile phase)	流速 ( flow rate) /mL · min <sup>-1</sup>	主峰出峰时间 ( retention time) /min	理论塔板数 ( number of theoretical plates)	相对保留时间( relative retention time)		主峰与杂质分离度 ( resolution of impurity)
					辅料 ( excipient)	杂质 ( impurity)	
Agilent - HC ( 250 mm ×4. 6 mm)	50: 50	1. 0	8. 133	4614	0. 28	0. 83	3. 24
VP - ODS ( 150 mm ×4. 6 mm)	50: 50	1. 0	5. 066	2190	0. 28	0. 82	2. 60
Agilent - HC ( 250 mm ×4. 6 mm)	55: 45	1. 0	13. 487	4427	0. 17	0. 79	4. 18
VP - ODS ( 150 mm ×4. 6 mm)	55: 45	1. 0	8. 452	2777	0. 17	0. 79	3. 41
Agilent - HC ( 250 mm ×4. 6 mm)	55: 45	1. 2	11. 211	4335	0. 17	0. 80	4. 02
VP - ODS ( 150 mm ×4. 6 mm)	55: 45	1. 2	6. 984	2571	0. 17	0. 79	3. 27

**3.9 含量测定** 取样品适量,加流动相稀释制成每 1 mL 中含盐酸罂粟碱约 60  $\mu\text{g}$  的溶液,作为供试品溶液;精密量取 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,记录色谱图;另精密称取盐酸罂粟碱对照品适量,同法操作,按外标法以峰面积计算样品中盐酸罂粟碱的含量,同时与采用中国药典 2005 年版二部收载的非水滴定法测定的结果进行比较,2 种方法测定结果基本一致。见表 4。

表 4 2 种方法含量测定结果比较(%)

Tab 4 Results of two assay methods

生产厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	高效液相 色谱法(HPLC)	非水滴定法(non- aqueous titration)
A	080101-1	98.85	97.94
A	061001-2	97.43	98.76
B	07100813	99.15	101.4
B	07022613	99.22	101.7
C	PH080101	99.40	99.66
C	PH070201	101.9	100.3

**3.10 有关物质测定** 取样品,加流动相稀释制成每 1 mL 中约含盐酸罂粟碱 1 mg 的溶液,作为供试

表 5 有关物质测定结果

Tab 5 Results of related substances determination

生产厂家 (manufacturer)	批号(Lot No.)	单个最大杂质 (the biggest impurity) /%	总杂质 (sum of impurities) /%	颜色(colour)	吸光度 ( $A_{450\text{nm}}$ )
A	080101-1	0.47	0.47	Y-6	0.1031
A	061001-2	0.62	0.62	Y-7	0.1822
B	07100813	0.17	0.17	Y-2	0.0196
B	07022613	0.16	0.16	Y-2	0.0337
C	PH080101	0.17	0.17	Y-2	0.0551
C	PH070201	0.23	0.23	Y-2	0.0479

#### 4 LC-MS 杂质鉴定

**4.1 LC 条件** 色谱柱:  $\text{C}_{18}$  柱(Sepax GP, 250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 0.1% 甲酸-乙腈(85:15); 流速: 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>。

**4.2 MS 条件** 采用 ESI 正离子方式检测,源电压为 3.5 kV,喷雾气压力为 0.2 MPa,干燥气流速 8 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,干燥气温度 350  $^{\circ}\text{C}$ 。

**4.3 样品中杂质的分离和鉴定** 取样品加水制成每 1 mL 含 1 mg 的供试品溶液,注入液质联用仪。色谱图见图 3,罂粟碱与杂质的一级质谱、二级质谱和杂质的三级质谱图见图 4,参考文献并经质谱解析,推测该杂质可能为罂粟碱的光氧化产物罂粟醇。

品溶液;精密量取上述供试品溶液 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。照含量测定项下的色谱条件,精密量取对照溶液和供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,计算单个最大杂质和各杂质峰面积的和(除溶剂峰及辅料峰外),结果表明:杂质主要为相对保留时间 0.8 的杂质。

**3.11 溶液的颜色** 取供试品溶液与中国药典 2005 年版二部附录 IX A 第一法中规定的黄色标准比色液(Y)比较,确定供试品溶液的颜色。另取供试品溶液,以水为空白,测定 450 nm 波长处的吸光度。结果表明:A 生产厂家的样品较 B、C 生产厂家样品的颜色深,450 nm 波长处的吸光度也大,且有关物质也高得多,有关物质与溶液的颜色呈正相关(表 5)。考察 3 个生产厂家的处方(表 1)发现,A 生产厂家处方中未加稳定剂 EDTA,提示 EDTA 可以降低杂质的产生,防止溶液颜色变深。

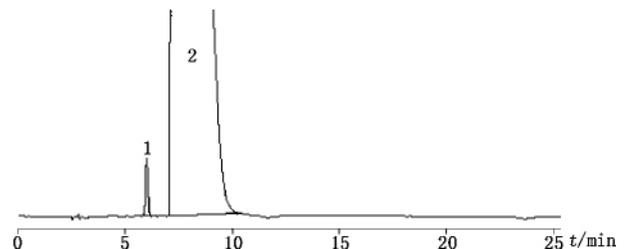


图 3 盐酸罂粟碱注射液色谱图

Fig 3 Chromatogram of papaverine hydrochloride injection

1. 杂质(impurity) 2. 罂粟碱(papaverine)

#### 5 讨论

**5.1** 由于药品颜色是药品内在质量的客观表征,颜色变深往往代表着降解物或杂质的增加,而药品中的相关杂质也是影响药品安全性的重要因素,因

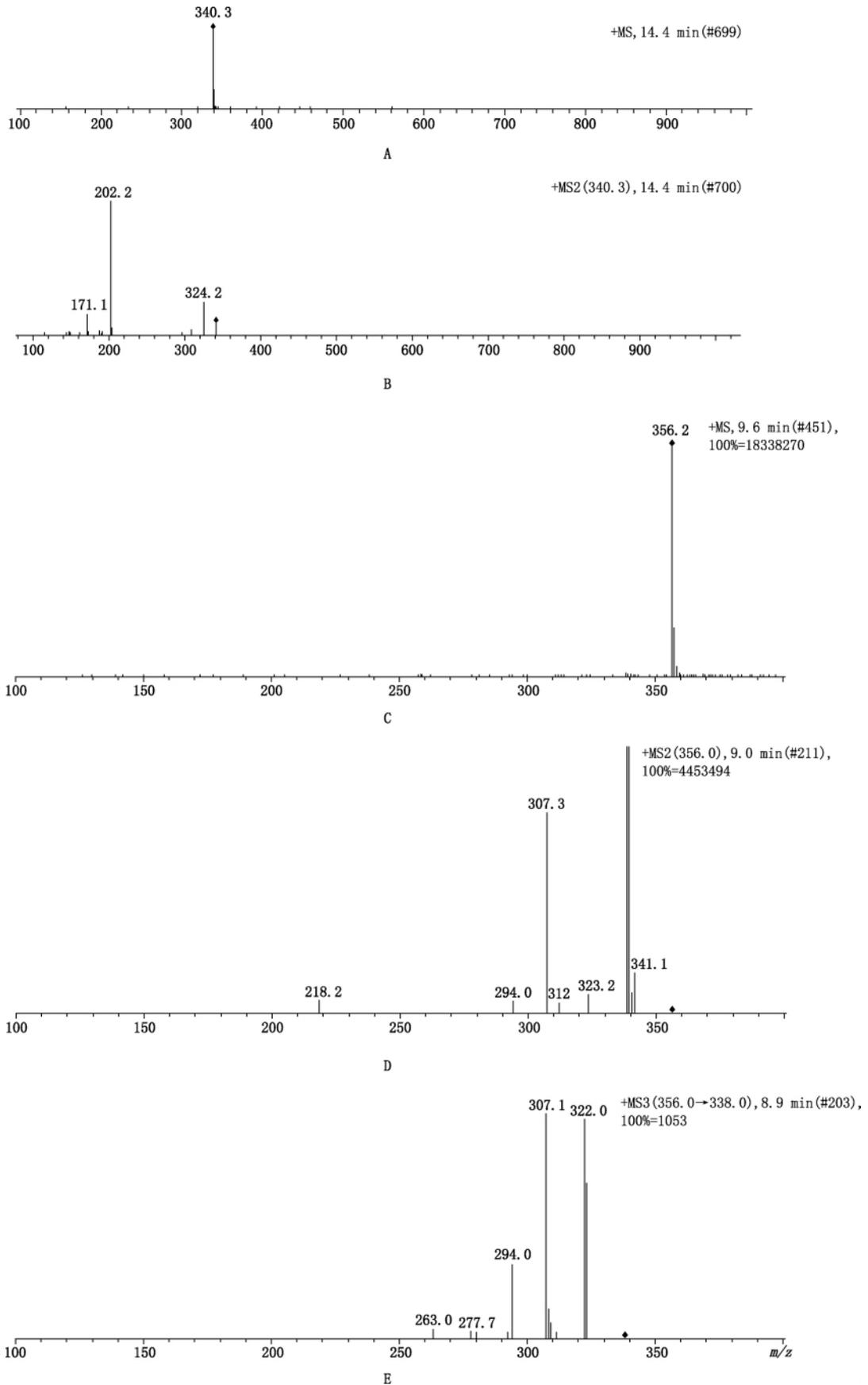


图4 罂粟碱(A,B)和杂质的质谱图(C,D,E) 质谱图

Fig 4 Positive ion mass spectra of papaverine(A,B) and impurity(C,D,E)

此本文将溶液的颜色、有关物质和处方工艺相结合,目的在于了解不同企业样品稳定性与处方工艺的相关性,为企业改进工艺,提高药品质量提供依据。有文献报道<sup>[5]</sup>罂粟碱盐类(盐酸盐和硫酸盐)的注射液由于溶解在溶液中氧致使罂粟碱降解,因此在灌封过程中需通入氮或二氧化碳以减少降解的可能。此外,即使生产过程中通入了中性气体,但样品在紫外光照下极易降解,产生罂粟醇、罂粟啶,最后生成棕色降解产物(化合物 X: 2, 3, 9, 10-四甲氧基-12-氧-12H-吲哚[2,1-a]异喹啉酰鎓),苯甲酸钠、4-羟基苯甲酸甲酯钠和对羟基苯甲酸丙酯钠等光保护剂可以起到稳定样品的作用<sup>[6]</sup>。

**5.2** 本实验发现处方中加入 EDTA 的样品颜色要浅于未加的样品,且有关物质也小于未加的样品,因此,EDTA 也具有抑制样品降解的作用。从质谱信息可知,在正离子模式下,杂质的一级质谱以  $[M + H]^+$   $m/z$  356.3 为基峰,其二级质谱较强峰为  $m/z$  338.3,是其分子离子  $m/z$  356.3 脱去 -OH 而产生,另有弱峰  $m/z$  218.2 为  $m/z$  356.3 失去 3,4-二甲氧基苄基而形成; $m/z$  338.3 裂解产生  $m/z$  322.0、 $m/z$  307.1、 $m/z$  294.0、 $m/z$  277.7、 $m/z$  263.0 等三级质谱碎片信息,可能分别为分子离子  $m/z$  338.3 脱去 -CH<sub>4</sub>(16)、-OCH<sub>3</sub>(31)、异喹啉环中 -C-OCH<sub>3</sub>(44) 成五元环,推测杂质可能为罂粟醇,与文献报道<sup>[5]</sup>一致,进一步确证工作我们将通过制备杂质对照品来进行。

**5.3** 尽管 3 个生产厂家的有关物质均未超过 1.0%,但由于没有杂质对照品,无法确定杂质和主成分的校正因子,仍采用自身对照法,故有关物质的量并不代表杂质的含量。且从含量测定结果看,样品(主要是未加 EDTA)的含量随着放置时间延长而降低,因此有必要在处方中加入稳定剂。

#### 参考文献

- 1 YAN Jin(闫瑾), ZHAO Mei-ping(赵美萍), LI Yuan-zong(李元宗) *et al.* Research progress in papaverine determination(罂粟碱检测方法研究进展). *Prog Chem*(化学进展) 2005 17(5): 897
- 2 LIU Xue-qi(刘学起), LI Dong(李栋), JIANG Xiao(姜潇) *et al.* HPLC determination of papaverine hydrochloride injection and its related substances(高效液相色谱法测定盐酸罂粟碱注射液的含量及有关物质). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2007 27(5): 762
- 3 LIN Zhi-min(凌志敏), HUANG Feng-ting(黄凤婷). Determination of papaverine hydrochloride for injection by HPLC(高效液相色谱法测定注射用盐酸罂粟碱的含量). *Int Med Hys Guid*(国际医药卫生导报) 2005 11(16): 105
- 4 Hermann TW, Girreser U, Michalski P *et al.* Oxidation and degradation products of papaverine. Part II [1]: investigations on the photochemical degradation of papaverine solutions. *Arch Pharm* 2003 336(9): 401
- 5 Piotrowska K, Hermann TW, Augustyniak W. Kinetics of photooxidation of papaverine hydrochloride and its major photooxidation products. *J Pharm Biomed Anal* 2006 41(4): 1391
- 6 Piotrowska K, Hermann TW, Augustyniak W. Photostabilization of papaverine hydrochloride solutions. *Acta Pol Pharm* 2010 67(4): 321

(本文于 2010 年 9 月 3 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告