

# RP-HPLC法测定注射用长春西汀的有关物质

袁利杰\*, 杨本霞, 陈杰(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.2;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1210-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.20

**摘要** 目的:建立测定注射用长春西汀中有关物质(包括已知杂质长春胺乙酯、阿朴长春胺、甲氧基长春西汀和其他杂质)的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Agela C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.2 mol/L 醋酸铵溶液(60:40),流速为 1.0 ml/min,柱温 30 ℃,检测波长 273 nm。结果:在选定的色谱条件下,主成分与有关物质能完全分离,长春胺乙酯、阿朴长春胺、甲氧基长春西汀检测质量浓度线性范围分别为 1.616~8.080、2.844~14.220、0.808 0~4.848 0 μg/ml(*r*均为 0.999 8),加样回收率(*n*=9)分别为 99.7%、100.5%、99.7%,RSD 分别为 1.3%、0.7%、1.0%,检测限分别为 2.323、1.138、2.323 ng。结论:该方法灵敏度高、专属性强、精密性好,能够有效控制注射用长春西汀中的已知杂质和其他有关物质的含量。

**关键词** 注射用长春西汀;有关物质;反相高效液相色谱法

## Determination of Related Substances in Vinpocetine for Injection by RP-HPLC

YUAN Li-jie, YANG Ben-xia, CHEN Jie(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances (known impurities including ethylvincamate, apovincamine, methoxyvinpocetine and other impurities) in Vinpocetine for injection. METHODS: RP-HPLC method was adopted. Agela C<sub>18</sub> column was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2 mol/L ammonium acetate solution (60:40) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column was maintained at 30 ℃ and detection wavelength was set at 273 nm. RESULTS: Related substances were completely separated from the main constituent. The linear range was 1.616-8.080 μg/ml for ethylvincamate (*r*=0.999 8), 2.844-14.220 μg/ml for apovincamine (*r*=0.999 8) and 0.808 0-4.848 0 μg/ml for methoxyvinpocetine (*r*=0.999 8). The average recoveries were 99.7% (RSD=1.3%), 100.5% (RSD=0.7%) and 99.7% (RSD=1.0%), respectively (*n*=9). The detection limits were 2.323, 1.138 and 2.323 ng, respectively. CONCLUSIONS: The sensitivity, precision and specificity of method can satisfy the requirements. It can be used for the quality control of known impurities and other related substance in Vinpocetine for injection.

**KEY WORDS** Vinpocetine for injection; Related substances; RP-HPLC

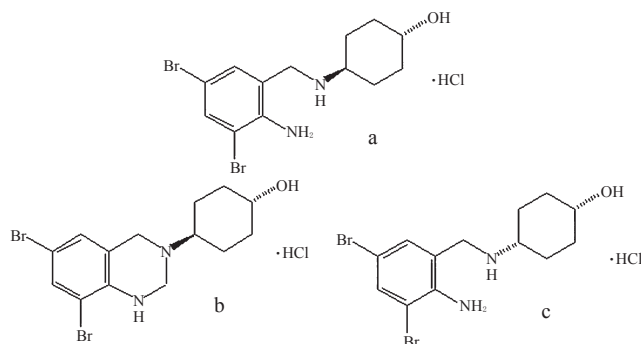


图5 盐酸氨溴索与部分已知杂质的分子结构式

a. 盐酸氨溴索; b. 化合物 1; c. 化合物 6

Fig 5 Molecular structure of ambroxol hydrochloride and partial known impurities

a. ambroxol hydrochloride; b. compound 1; c. compound 6

响有关物质的检查,因此“2.4.1”项下的系统适用性试验主要考察主成分、6种已知杂质和5种防腐剂的分离效果。

2010年版《中国药典》(二部)中盐酸氨溴索及其制剂均采

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 化学药品分析及质量标准。

E-mail: yuanlij@126.com

用等度洗脱的HPLC法进行含量测定和有关物质检查<sup>[3]</sup>,该色谱系统无法保证本品中多组分的有效分离。采用梯度洗脱法,可以使盐酸氨溴索主成分与各已知杂质、各防腐剂之间得到良好分离,更有利于有关物质的检查,提高测定结果准确度。本文的色谱系统也已经用于国家评价性抽验中盐酸氨溴索糖浆、颗粒、口腔崩解片等其他制剂的有关物质考察。

综上,该方法专属性好、灵敏度高、结果准确,可用于盐酸氨溴索制剂的有关物质考察。

### 参考文献

- [1] 范国荣,李珍,胡晋红,等.盐酸氨溴索口服溶液的相对生物利用度研究[J].中国现代应用药学杂志,2001,18(2):105.
- [2] 王曦,何海霞.2种盐酸氨溴索制剂的人体生物等效性研究[J].中国药房,2011,22(6):516.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:766.
- [4] 王斌,李仲苇,钟明康,等.盐酸氨溴索注射剂质量考察[J].药物分析杂志,2006,26(10):1448.
- [5] 李小安,吴少平,刘海静,等.盐酸氨溴索口服溶液中苯甲酸钠的含量测定方法学研究[J].安徽医药,2011,15(1):40.

(收稿日期:2012-06-18 修回日期:2012-07-11)

长春西汀(Vinpocetine, VIN)是吡啶类生物碱长春胺的衍生物,为脑循环代谢改善剂,能增加脑血流量并提高葡萄糖的利用率,减少脑血管阻力,为预防及治疗脑动脉硬化症、脑出血后遗症的临床常用药物之一。临床证明其长期应用不良反应少、程度轻、耐受性好,具有广阔的应用前景<sup>[1-3]</sup>。目前有文献<sup>[4-6]</sup>报道采用高效液相色谱(HPLC)法对不同制剂的长春西汀有关物质进行测定;另外国国家进口药品注册标准JX20070232中记载了长春西汀原料的检测方法;对注射用长春西汀的检测则有局颁标准(试行)YBH04762003,但该标准只用了自身对照法测定总杂质的含量。本文在YBH04762003标准基础上对注射用长春西汀的有关物质检测方法进行了标准提高,主要采用反相(RP)-HPLC法测定注射用长春西汀的有关物质,利用对照品法计算已知杂质长春胺乙酯(杂质a)、阿朴长春胺(杂质b)、甲氧基长春西汀(杂质c)的量,自身对照法计算其他杂质和总杂质的量。结果表明,此法灵敏度高、专属性强,可用于注射用长春西汀有关物质的含量测定。

## 1 材料

Waters2695 HPLC 仪、2996 型二极管阵列检测器(美国 Waters 公司)。

长春西汀对照品(批号:AET080705,纯度:100%)、杂质 a 对照品(批号:VET050705,纯度:100%)、杂质 b 对照品(批号:AVM050705,纯度:100%)、杂质 c 对照品(批号:MTX250210,纯度:100%)均由瑞士 Linnera SA 公司提供;注射用长春西汀(某公司提供,批号:1009014、1002023、1201021、1103011、1012013,规格:均为每支 30 mg;批号:1008043、1011023、1109013、1002014、1201082,规格均为每支 10 mg);乙腈为色谱纯,其余均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agela C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2 mol/L 醋酸铵溶液(60:40),流速:1.0 ml/min;检测波长:273 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在此色谱条件下,3 个已知杂质与主成分的出峰顺序依次为杂质 a、杂质 b、杂质 c 和长春西汀;理论板数按长春西汀峰计算为 18 560;长春西汀峰与相邻杂质峰的分离度为 5.6,均符合规定。

### 2.2 辅料干扰试验

按处方要求,称取辅料甘露醇适量,加流动相制成每 1 ml 约含 13 mg 的溶液,按“2.1”项下色谱条件进样 20 μl。结果,辅料在 273 nm 的检测波长下不干扰注射用长春西汀有关物质的测定,详见图 1A。

### 2.3 杂质 a、b、c 检测限及定量限试验

取杂质 a、b、c 质量浓度分别为 1.616、0.113 8、3.232 μg/ml 的溶液,用流动相逐级稀释为所需的不同的质量浓度的溶液,分别进样 20 μl。当信噪比为 3:1 时,测得杂质 a、杂质 b、杂质 c 的检测限分别为 2.323、1.138、2.323 ng;当信噪比为 10:1 时,测得杂质 a、b、c 的定量限分别为 8.08、3.413、9.696 ng。

### 2.4 杂质 a、b、c 的线性试验

取杂质 a、b、c 对照品适量,用流动相配制以下质量浓度:杂质 a 分别为 1.616、3.232、4.848、6.464、8.080 μg/ml;杂质 b 分别为 2.844、5.688、8.532、11.376、14.220 μg/ml;杂质 c 分别为 0.808 0、1.292 8、1.616 0、3.232 0、4.848 0 μg/ml。分别进样 20 μl,记录峰面积(A)。以溶液质量浓度(c)为横坐标,A 为纵坐

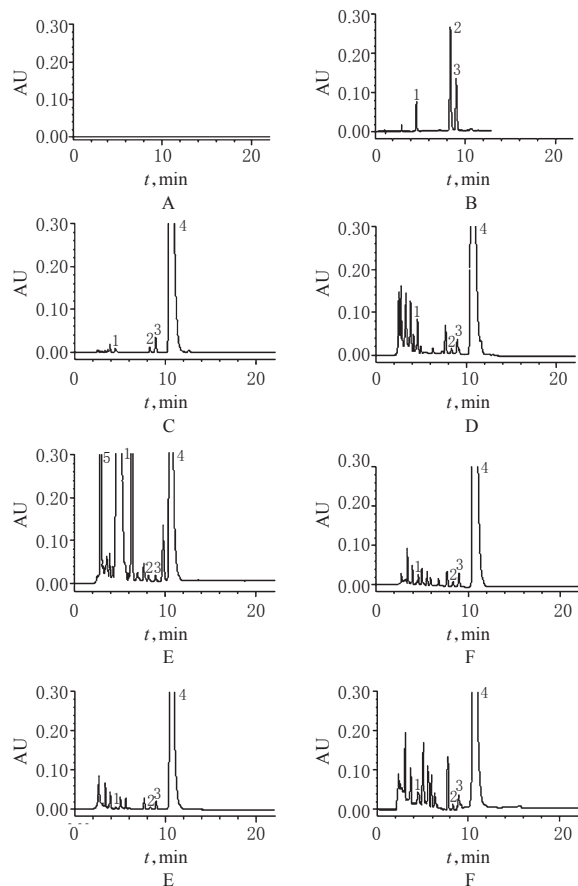


图 1 高效液相色谱图

A. 辅料(甘露醇);B. 杂质对照品;C. 未经破坏样品;D. 高温破坏样品;E. 氧化破坏样品;F. 酸破坏样品;G. 碱破坏样品;H. 光照破坏样品;1. 杂质 a;2. 杂质 b;3. 杂质 c;4. 长春西汀;5. 氧化剂

Fig 1 HPLC chromatograms

A. excipient (mannitol); B. impurity control; C. non-destroyed sample; D. samples destroyed by high temperature; E. samples destroyed by oxidation; F. samples destroyed by acid; G. samples destroyed by alkali; H. samples destroyed by light; 1. impurity a; 2. impurity b; 3. impurity c; 4. vinpocetine; 5. oxidant

标,进行线性回归,得杂质 a 的线性方程为: $A=25\ 083c-2\ 246.3(r=0.999\ 8)$ ;杂质 b 的线性方程为: $A=39\ 975c-9\ 063.1(r=0.999\ 8)$ ;杂质 c 的线性方程为: $A=30\ 390c-2\ 679.8(r=0.999\ 8)$ 。结果表明,杂质 a、b、c 的检测质量浓度线性范围分别为 1.616~8.080、2.844~14.220、0.808 0~4.848 0 μg/ml。

### 2.5 杂质 a、b、c 和长春西汀的精密度和稳定性试验

取杂质 a、b、c 和长春西汀质量浓度分别为 3.232、5.688、3.232、1.578 μg/ml 的溶液,连续进样 5 次,测定其峰面积,计算其 RSD 分别为 1.5%、1.4%、1.6% 和 1.3% (n=5),表明本法的精密度良好。用上述同样的溶液和色谱条件,每隔 4 h 进样 1 次,直至 20 h 测定峰面积,计算其 RSD 分别为 0.8%、1.5%、1.0% 和 1.3% (n=5),表明各溶液在 20 h 内基本稳定。

### 2.6 杂质 a、b、c 回收率试验

称取供试品适量,加流动相制成质量浓度为 0.4 mg/ml 的供试品溶液;再称取 3 种杂质对照品适量,制成杂质 a、b、c 质量浓度分别为 3.232、5.688、3.232 μg/ml 的对照品混合溶液。精密量取供试品溶液 10 ml,分别置于不同的 6 个 25 ml 量瓶中,

再量取对照品混合溶液0、0.5、1.0、2、5、10 ml,分别置于上述6个25 ml量瓶中;再精密量取供试品溶液20 ml和对照品混合溶液5 ml,置于同一个50 ml量瓶中;上述量瓶分别用流动相稀释至刻度,制成3种杂质的低、中、高质量浓度溶液。精密量取20  $\mu$ l注入液相色谱仪,每个样品溶液连续进样3次,记录峰面积,以外标法计算含量及回收率。结果,杂质a、b、c的总平均回收率( $n=9$ )分别为99.7% (RSD=1.3%)、100.5% (RSD=0.7%)、99.7% (RSD=1.0%),详见表1。

表1 回收率试验结果( $n=3$ )

成分	质量浓度	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %	平均RSD, %
杂质a	低	100.3	99.7	1.9	1.3
	中	100.0		1.7	
	高	98.7		0.3	
杂质b	低	101.1	100.5	0.1	0.7
	中	99.7		0.6	
	高	100.7		0.3	
杂质c	低	98.5	99.7	1.0	1.0
	中	98.7		1.0	
	高	102.0		0.4	

## 2.7 方法的专属性试验

取样品适量,进行不同条件下的降解试验,试验条件依次是:(1)未经破坏;(2)高温破坏:样品在110  $^{\circ}$ C条件下放置4 h;(3)氧化破坏:加入30%的过氧化氢溶液1 ml,室温放置60 min;(4)酸破坏:加入0.1 mol/L盐酸溶液1 ml,摇匀,室温下放置60 min后用碱中和;(5)碱破坏:加入0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,摇匀,室温下放置60 min后,用酸中和;(6)光照破坏:在照度为4 500 lx的光照箱内照射3 d。6种条件下的样品均用流动相稀释制成质量浓度为0.4 mg/ml溶液,摇匀,进样20  $\mu$ l。色谱见图1C~F,对照品混合溶液色谱见图1B。

从图1可见,与未破坏溶液色谱图比较,高温、氧化、光照破坏条件下检出了更多的杂质峰,已知杂质峰峰面积也有不同程度的增加;另外在氧化、碱性溶液破坏条件下,长春西汀的峰面积明显减小。所有杂质峰均能与主成分峰很好地分离,表明该法的专属性较强。

## 2.8 样品中杂质a、b、c和其他有关物质的测定

称取样品适量,加流动相并定量稀释制成质量浓度为0.4 mg/ml的溶液作为供试品溶液;取适量稀释成质量浓度为4  $\mu$ g/ml的溶液作为对照溶液;精密称取杂质a、b、c对照品适量,加流动相溶解并定量稀释制成每1 ml中分别约含3、6、1.5  $\mu$ g的溶液作为对照品溶液。对不同批号的10批样品的有关物质进行测定,并记录色谱图至主成分峰保留时间的2倍。以外标法计算杂质a、b、c的量,以自身对照法计算其他单个最大杂质和总杂质的量,结果见表2。

## 3 讨论

笔者对流动相进行了考察,YBH04762003标准中流动相为甲醇-乙腈-碳酸铵-乙醚的混合溶液,成分过于复杂。在保

表2 10批注射用长春西汀的有关物质含量测定结果

Tab 2 Content determination results of impurities and related substance in 10 batches of Vinpocetine for injection

批号	杂质a含量, %	杂质b含量, %	杂质c含量, %	其他单个最大杂质含量, %	总杂质含量, %
1009014	0.01	0.03	0.15	0.06	0.41
1002023	0.01	0.03	0.16	0.10	0.61
1201021	未检出	0.04	0.13	0.09	0.30
1103011	未检出	0.05	0.15	0.11	0.40
1012013	未检出	0.02	0.14	0.09	0.32
1008043	0.05	未检出	未检出	0.04	0.58
1011023	0.01	0.01	0.15	0.04	0.49
1109013	未检出	0.06	0.17	0.02	0.27
1002014	0.02	0.03	0.15	0.05	0.52
1201082	未检出	0.04	0.14	0.06	0.25

证良好的柱效和分离度的前提下,本法选择的流动相更加简单、环保。另外对试验检测波长也进行了研究,用2996型二极管阵列检测器,在210~400 nm波长范围内进行扫描,提取3种已知杂质和长春西汀的光谱图,可知杂质a、b、c和长春西汀在273 nm的波长处均有较强的吸收,所以本试验选择273 nm为检测波长。

不同条件下的降解试验表明注射用长春西汀对酸、碱、氧化剂、热、光照均有一定的敏感,尤其在高温、氧化、光照条件下会产生过多的杂质,氧化剂和碱性溶液能使其快速降解;同时10批注射用长春西汀的检验结果也说明放置越久的样品(如批号为1002023、1008043、1002014的样品)杂质含量相对较高,所以在生产、贮存、运输过程中应注意环境条件的影响。这也表明本文选定的色谱条件可行,能够保证杂质的有效检出,以有效控制样品质量,保证用药安全。

综上,本法灵敏度高、专属性强、精密度好,能够有效控制注射用长春西汀中的已知杂质和其他有关物质的含量,以更好地控制药品的质量。

## 参考文献

- [1] 刘国磊,王帅,王静,等.长春西汀聚乳酸-聚乙醇酸缓释微球的研制[J].中国药房,2012,23(13):1 203.
- [2] 王春富,汤新强.长春西汀的临床应用进展[J].大连医科大学学报,2009,31(3):364.
- [3] 陈鹰,杜蓉,刘宏,等.长春西汀固体过饱和自乳化释药系统的研制[J].中国药房,2010,21(29):2 750.
- [4] 张小娟,龚伟,蒋金富,等.RP-HPLC测定长春西汀冻干乳剂的含量及其有关物质[J].军事医学科学院院刊,2011,34(2):143.
- [5] 王祥.高效液相色谱法测定长春西汀(片)的含量及其有关物质的研究[J].药物分析杂志,1995,15(4):23.
- [6] 戚颖.HPLC法测定长春西汀注射液的含量[J].适宜诊疗技术,2002,20(6):2.

(收稿日期:2012-06-04 修回日期:2012-07-13)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅