

HPLC 检测磷酸可待因中的有关物质

胡菲菲¹, 胡延雷², 苗庆柱², 杨哲洲¹, 张福利^{1*} (1.中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 201203; 2.国药集团工业有限公司, 北京 101301)

摘要: 目的 建立 HPLC 检测磷酸可待因中的有关物质。方法 采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以缓冲溶液(0.2%磷酸二氢钾 1%庚烷磺酸钠的水溶液, 磷酸调 pH 至 3.2±0.2)-甲醇(7:3)为流动相 A; 以流动相 A-乙腈(6:4)作为流动相 B, 采用梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 245 nm, 柱温 40 °C。结果 该方法主成分与各杂质(A~K)间分离度>1.5。主成分及其各杂质在各自浓度范围内呈现良好的线性关系($r>0.999$); 平均回收率为 96.7%~103.8%, RSD 为 1.4%~6.0%。结论 该方法操作简单、专属性好、重复性好、准确度高, 适用于磷酸可待因的有关物质的测定。

关键词: 磷酸可待因; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)17-2171-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.17.011

引用本文: 胡菲菲, 胡延雷, 苗庆柱, 等. HPLC 检测磷酸可待因中的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2171-2176.

Determination of the Related Substance of Codeine Phosphate by HPLC

HU Feifei¹, HU Yanlei², MIAO Qingzhu², YANG Zhezhou¹, ZHANG Fuli^{1*} (1.Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2.China National Pharmaceutical Industry Corporation Ltd., Beijing 101301, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of the related substances in codeine phosphate. **METHODS** The test was based on an octadecylsilyl silica gel column; the mobile phase A consisted of 0.2% potassium dihydrogen phosphate and 1% sodium heptanesulfonate (pH was adjusted to 3.2±0.2 with phosphoric acid)- methanol(7:3), the mobile phase B consisted of mobile phase A and acetonitrile(6:4), with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 245 nm; the column temperature was 40 °C. **RESULTS** The separation between the main component of the method and each impurity(A~K) were >1.5. The calibration curves of codeine and known impurities were linear in the self-concentration range; and the average recovery rates($n=9$) were in the range of 96.7%~103.8% while RSDs were in the range of 1.4%~6.0%. **CONCLUSION** The method is improved with good specificity and linearity. The self-control method for proposed main component with correction factors is suitable for the quality control of this drug.

KEYWORDS: codeine phosphate; HPLC; related substance

磷酸可待因化学名为 17-甲基-3-甲氧基-4,5 α -环氧-7,8-二去氢吗啡喃-6 α -醇磷酸盐半水合物, 是可待因临床上的常用磷酸盐。可待因是阿片受体激动剂, 作用于中枢神经系统, 对延髓的咳嗽中枢有选择性地抑制的作用, 且镇咳作用强而迅速。可待因也有镇痛作用, 其镇痛作用约为吗啡的 1/12~1/7, 但强于一般解热镇痛药。可待因能抑制支气管腺体的分泌, 可使痰液粘稠, 难以咳出, 故不宜用于多痰粘稠的患者。临床上可待因常用于治疗感冒、发热过高、头痛、肌肉痛, 但长期用药会引起依赖性。除吗啡外, 可待因是鸦片含量最高的生物碱, 虽然可以从天然产物中提取, 但现代制药行业主要采用半合成方式。为确保本

品的安全性, 必须对药物在生产、储存及运输等环节中产生的有关物质进行监控, 建立相应的控制方法。本研究采用 HPLC 对磷酸可待因杂质及强降解产物进行研究, 建立了一种可同时检测本品中 11 个有关物质的检测方法^[1-4], 根据 ICH 指导原则对方法进行了验证^[5-6]。通过采用加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量, 能有效评价药物的质量, 为制剂的质量控制提供参考。

根据杂质来源可将磷酸可待因的有关物质分为 3 类: ①原料引入: 杂质 B(吗啡)、G(蒂巴茵); ②工艺副产物: 杂质 A(主要是由原料吗啡 6 位羟基同时甲基化生成的甲基可待因); 杂质 C(两分子可待因聚合生成的可待因二聚体); 杂质 D(一分子

作者简介: 胡菲菲, 女, 硕士生 Tel: 021-20572000-5037
Tel: 021-20572000-5069 E-mail: zhangfulisipi@126.com

E-mail: hufei_fei@163.com *通信作者: 张福利, 男, 研究员, 博士生导师

吗啡与一分子可待因聚合形成吗啡可待因二聚体); 杂质 F(14-羟基可待因) 和杂质 K(α -codeimethine); ③降解杂质: 杂质 E(10-羟基可待因)、杂质 H(可待因氮氧化物)、杂质 I(去甲可待因)、杂质 J(可待因酮)。磷酸可待因作为一个具有悠久历史的止咳与镇痛药, 被 EP、USP、中国药典等多国药典收录^[7-9], 并设立了有关物质的质量标准。其中中国药典有关物质仅控制了杂质 B, EP 中报道了杂质 A、B、C、D、E、F、G, 而 USP 中主要研究了杂质 A、E、H、I、J, 各国药典对磷酸可待因的质量研究部分并没有一个全面的杂质谱研究。笔者根据药典报道及相关文献介绍总结了较全面的杂质谱及最严格的限度标准, 并在此基础上开发了用于检测杂质含量的色谱方法并做了方法学验证, 对原料药的质量有一个更加全面的研究。

1 仪器与试剂

Thermo U3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞

公司)(包括四元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, 变色龙色谱工作站); CPA-225D 分析天平(德国赛多利斯); PB-10 pH 计(德国赛多利斯)。

乙腈(色谱级, 霍尼韦尔); 甲醇(色谱级, 霍尼韦尔); 庚烷磺酸钠(色谱级, Fluka); 磷酸二氢钾(分析纯)、磷酸(分析纯)、磷酸可待因样品(批号: LKS170801, LKS170802, LKS170803)均购自国药集团工业有限公司; 蒸馏水(屈臣氏); 杂质 A(批号: A-170103; 纯度: 99.1%); 杂质 B(批号: B-170105; 纯度: 97.3%); 杂质 C(批号: C-170117; 纯度: 98.7%); 杂质 D(批号: D-170119; 纯度: 97.6%); 杂质 E(批号: E-170118; 纯度: 96.8%); 杂质 F(批号: F-170905; 纯度: 95.8%); 杂质 G(批号: DBY-160616; 纯度: 99.0%); 杂质 H(批号: H-161230; 纯度: 99.5%); 杂质 I(批号: I-170105; 纯度: 98.6%); 杂质 J(批号: J-161229; 纯度: 96.5%); 杂质 K(批号: K-170406; 纯度: 95.0%)。杂质 B

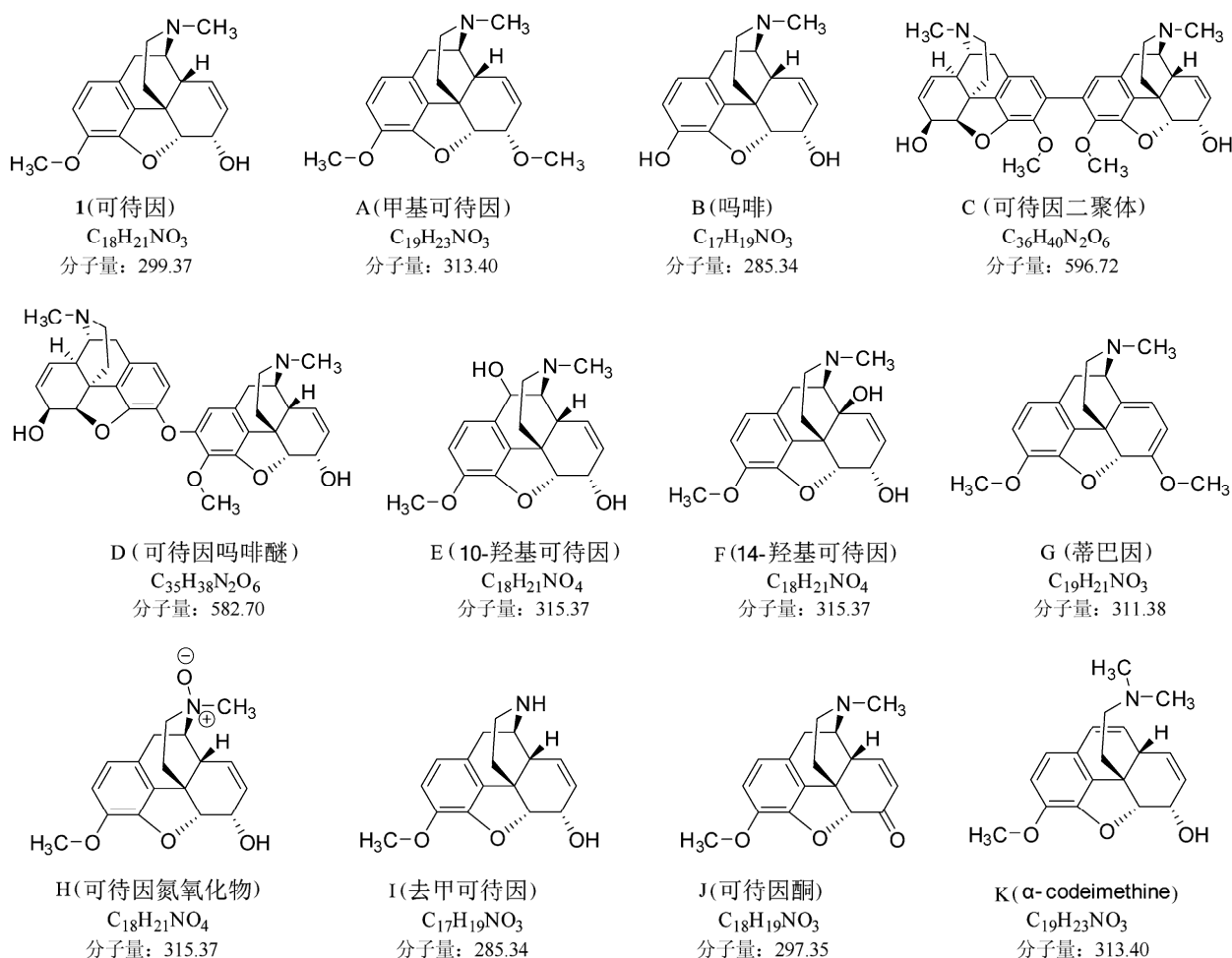


图1 可待因及有关物质化学结构信息

Fig. 1 Chemical structures of codeine and its related substances

和 G 由国药集团工业有限公司提供, 其它杂质均由上海医药工业研究院合成提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以缓冲溶液(0.2%磷酸二氢钾 1%庚烷磺酸钠的水溶液, 磷酸调 pH 至 3.2 ± 0.2)-甲醇(7:3)为流动相 A; 以流动相 A-乙腈(6:4)作为流动相 B, 采用梯度洗脱: 0~20 min, 100%A; 40~45 min, 50%A; 53 min, 25%A; 59 min, 0%A; 59.5~66 min, 100%A。流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 245 nm, 柱温为 40°C 。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品贮备液的配制 称取适量已知杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 和可待因对照品, 加稀释剂[0.5%磷酸水溶液-甲醇(7:3)]溶解制成浓度均为 $44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的贮备液。

2.2.2 供试品溶液的配制(含可待因 $2.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 称取磷酸可待因样品 30 mg 至 10 mL 量瓶中, 加入样品稀释剂溶解, 定容, 摇匀, 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 针式滤膜过滤, 取续滤液备用。

2.2.3 对照溶液(1%自身对照)的配制 取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL, 至 100 mL 量瓶中, 加稀释剂定容, 摇匀, 即得。

2.3 系统适用性和专属性

2.3.1 系统适用性 取空白溶液(稀释剂)、混合对照品贮备液和供试品溶液注入仪器系统, 供试品溶液中按照可待因峰计算理论板数 ≥ 5000 , 混合对照品贮备液中各色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均 >1.5 , 拖尾因子在 0.9~1.1 之间, 空白溶液在主峰和杂质峰处无干扰, 混合对照品贮备液参考色谱图, 见图 2。

2.3.2 强制降解试验 未破坏溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 稀释剂溶解后定容至 10 mL, 摇匀, 作为溶液 a。

酸破坏溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 加 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液 1 mL, 90°C 水浴 6 h, 加 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液中和, 再用稀释剂定容, 摇匀, 作为溶液 b。

高温破坏溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 加稀释剂 5 mL 溶解, 于 90°C 水浴 6 h, 取出, 放置室温, 稀释剂定容, 摇匀, 作为溶液 c。

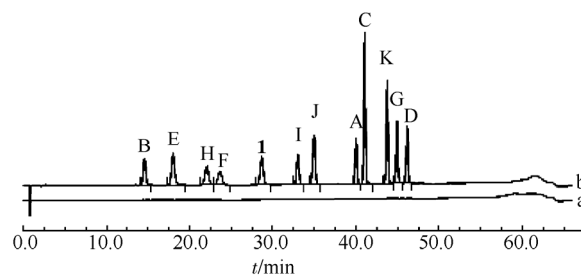


图 2 高效液相色谱图

a-空白溶液; b-系统适用性溶液。

Fig. 2 HPLC chromatograms

a-blank solution; b-system suitability solution.

氧化破坏溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 加入 10% H_2O_2 1 mL, 60°C 水浴 20 h, 加稀释剂定容, 摇匀, 作为溶液 d。

碱破坏溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 加 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 1 mL, 60°C 水浴 20 h, 加 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液中和, 再用稀释剂定容, 摇匀, 作为溶液 e。

光照降解溶液的制备: 称取磷酸可待因 30 mg, 稀释剂溶解后定容至 10 mL, 摇匀, 在白炽灯 4 500 Lx 加紫外 $80 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ 条件下照射 3 d, 取出作为溶液 f。

精密量取以上各溶液 10 μL , 注入色谱仪, 同时采用二极管阵列检测器进行紫外扫描, 波长扫描范围为 200~400 nm, 结果表明本品对高温较稳定, 杂质个数和总量无明显变化; 酸条件下仅降解出少量杂质 B; 碱条件下主要降解为杂质 I、A、H 和少量未知杂质; 氧化条件下主要降解杂质为杂质 H 和 J; 光照条件下主要降解为杂质 E、H、I、J。各破坏条件下所产生的降解产物均与可待因能很好地分离, 各降解产物之间也能较好地分离, 峰纯度分析显示各破坏溶液的色谱图中可待因均为单一峰, 峰纯度 >990 , 物料保持平衡。说明此方法专属性好, 能有效检测样品中的降解产物。色谱图见图 3。

2.4 线性关系考察

分别称取可待因样品及各杂质的对照品适量, 稀释剂溶解制成浓度分别为 $44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合线性储备溶液, 并逐步稀释制成浓度分别为 0.22, 0.55, 1.1, 2.2, 4.4, 11, 22, $44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度的对照品混合溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 将杂质和可待因的浓度与其相对应的峰面积进行线性回归分析, 计算其线性相关系数 r 及 Y 轴截距值, 结果见表 1。

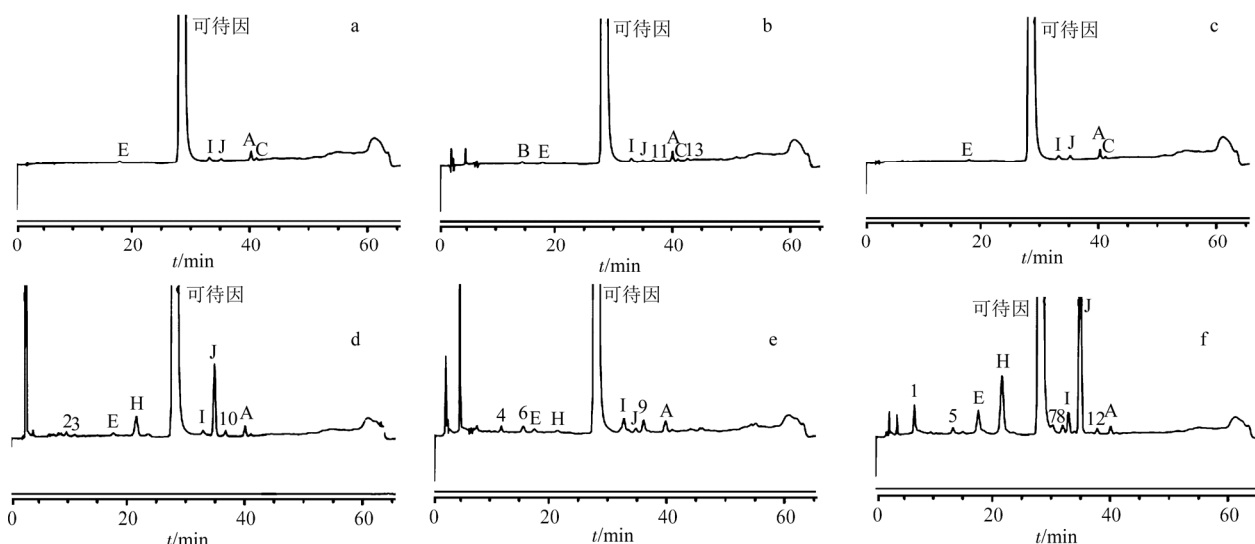


图3 高效液相色谱图

a-未破坏溶液；b-酸破坏溶液；c-高温破坏溶液；d-氧化破坏溶液；e-碱破坏溶液；f-光照破坏溶液；1-13-未知杂质。

Fig. 3 HPLC chromatograms

a-no degradation; b-degradation in acid solution; c-degradation at high temperature in solution; d-oxidative degradation; e-degradation in alkali solution; f-degradation light damage in solution; 1-13-unknown impurity.

表1 线性检测结果

Tab. 1 Results of linear

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	校正 因子
可待因	$y=0.098\ 6x-0.003\ 5$	1.000 0	1.132 2~45.288 8	-
A	$y=0.098\ 4x+0.004\ 0$	1.000 0	1.105 3~44.211 2	1.00
B	$y=0.075\ 9x-0.003\ 9$	0.999 9	1.107 5~44.298 2	1.31
C	$y=0.284\ 4x-0.012\ 1$	1.000 0	1.069 6~42.783 2	0.35
D	$y=0.115x+0.005\ 6$	1.000 0	1.094 3~43.771 2	0.85
E	$y=0.117\ 1x-0.013\ 2$	1.000 0	1.102 4~44.094 8	0.84
F	$y=0.067\ 3x+0.012\ 9$	0.999 9	1.045 6~41.825 9	1.46
G	$y=0.128x-0.014$	1.000 0	1.105 2~44.208 4	0.77
H	$y=0.082\ 3x-0.001\ 8$	1.000 0	1.079 9~43.194 3	1.20
I	$y=0.086\ 1x-0.001$	1.000 0	1.082 4~43.296 6	1.14
J	$y=0.143\ 5x+0.002\ 8$	1.000 0	1.099 5~43.979 7	0.69
K	$y=0.197\ 6x-0.000\ 6$	1.000 0	1.057 6~42.304 8	0.50

2.5 检测限和定量限

取“2.4”项下混合储备溶液，用稀释液逐级稀释，并进样分析，按信噪比 $S/N>3$ 计算检测限，其中可待因及其杂质 B、E、F、H、I 检测限浓度 $0.55\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，杂质 A、C、D、G、J、K 检测限浓度 $0.22\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以信噪比 $S/N>10$ 计算定量限，可待因及其杂质 B、E、F、H、I 的定量限浓度为 $1.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；杂质 A、C、D、G、J、K 的定量限浓度为 $0.55\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。定量限浓度下，连续进样 6 针可待因、杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 峰面积的 RSD 分别为 8.7%，4.2%，5.3%，0.7%，7.2%，3.6%，6.6%，4.4%，9.8%，6.3%，

8.5%，2.1%。结果表明本法灵敏度较好。

2.6 回收率试验

分别精密称取磷酸可待因约 30 mg 于 10 mL 量瓶中(含可待因 $2.2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)，共 9 份，分别加入杂质对照品混合溶液适量，低浓度水平各杂质添加浓度为 $1.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (即样品浓度 0.05% 的限度水平)，中浓度(100% 各杂质限度)水平杂质添加浓度为 A $11\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，C、D $4.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，E、H、I、J $3.3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，B、F、G、K $2.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，高浓度(200% 各杂质限度)水平杂质添加浓度为 A $22\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，C、D $8.8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，E、H、I、J $6.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，B、F、G、K $4.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，每个浓度水平各 3 份。另同法配制不加杂质对照品的供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行分析，计算回收率。结果见表 2。

2.7 重复性试验

按照“2.6”项下中浓度(杂质限度)水平平行配制 6 份样品溶液，分别取 1 mL 于 100 mL 量瓶中，稀释制成 1% 的自身对照溶液。按“2.1”项下色谱条件进行分析，以 1% 自身对照法计算单个杂质含量和总杂质含量，并计算其 RSD。平行制备的 6 份样品溶液中，杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 的 RSD 分别为 1.2%，3.0%，1.0%，2.0%，1.8%，2.9%，2.1%，1.6%，2.0%，1.8%，2.1%，总杂质含量 RSD 为 1.2%。结果显示该方法重复性良好。

表 2 回收率测定结果($n=9$)

Tab. 2 Results of recovery test($n=9$)

A				B				C				D			
加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %
0.0484	0.0468			0.0508	0.0531			0.0480	0.0491			0.0491	0.0517		
0.4993	0.4851	96.7	3.0	0.1011	0.1024	102.2	4.0	0.1907	0.1973	102.7	1.4	0.1954	0.1932	100.2	4.5
1.0077	0.9682			0.2040	0.2059			0.3849	0.3936			0.3943	0.3802		
E				F				G				H			
加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %
0.0486	0.0508			0.0473	0.0456			0.0510	0.0517			0.0511	0.0538		
0.1437	0.1461	102.3	3.3	0.0940	0.0956	99.3	5.0	0.1016	0.1025	100.7	1.5	0.1524	0.1593	103.8	2.2
0.2927	0.2948			0.1897	0.1891			0.2050	0.2047			0.3075	0.3120		
I				J				K							
加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %	加入/ %	测得/ %	回收率/ %	RSD/ %
0.0484	0.0487			0.0494	0.0522			0.0486	0.0498						
0.1445	0.1453	99.5	2.7	0.1475	0.1417	98.2	6.0	0.0967	0.1017	103.7	2.6				
0.2917	0.2839			0.2976	0.2766			0.1951	0.2020						

2.8 中间精密度试验

由不同的分析人员,使用不同的仪器、不同的色谱柱在不同的日期对重复性试验项下相同批次的磷酸可待因进行分析,按照“2.7”项下方法平行配制 6 份样品溶液以及 6 份 1%自身对照品溶液,以 1%对照品溶液计算单个和总的有关物质的量,并计算其制备的 6 份样品的 RSD 及 2 个分析人员制备的 12 份样品的 RSD。另一个分析人员制备的 6 份样品中,杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 的 RSD 分别为 0.7%, 1.6%, 1.0%, 0.8%, 1.2%, 2.6%, 1.6%, 2.1%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 总杂质 RSD 为 0.9%。2 位分析人员制备的 12 份样品中,杂质 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 的 RSD 分别为 1.0%, 3.0%, 1.9%, 2.3%, 1.8%, 3.2%, 3.3%, 2.6%, 1.7%, 2.9%, 2.8%, 总杂质 RSD 为 1.0%。结果显示该方法中间精密度达到要求。

2.9 耐用性试验

2.9.1 溶液稳定性 按照“2.2.2”项下方法配制供试品溶液,在 0 d 进行测定。将样品溶液分别储存于室温(25 ℃)1, 2, 3 d 后进行测定,记录可待因及各杂质的峰面积。结果表明样品溶液在室温保存 3 d 后,样品溶液中单个有关物质含量的差值 <0.02%, 总杂质含量的差值为 0.02%。结果显示

样品溶液在室温 3 d 内稳定性良好。

2.9.2 滤膜影响 按“2.6”项下回收率试验的杂质限度浓度水平制备样品溶液,并按“2.2.3”项下方法稀释制备成 1%的自身对照溶液。同时取样品溶液用有机滤膜过滤,弃去最初 0.5 mL 溶液,续滤液进行分析,另取样品离心后直接进样,按 1%自身对照法计算可待因杂质的量。样品溶液在 2 种条件下,所测得有关物质的含量变化为 0.00%。过滤后溶液没有引入新的干扰峰,2 种条件下样品中杂质峰个数与测定量均一致,结果显示滤膜对测定结果没有影响。

2.9.3 方法耐用性 按“2.6”项下回收率试验的杂质限度浓度水平制备样品溶液,并按“2.2.3”项下方法稀释制备成 1%的自身对照溶液。按照“2.1”项下色谱条件,分别考察了同型号不同批次色谱柱、流速(0.9, 1.1 mL·min⁻¹)、柱温(35, 45 ℃)、检测波长(244, 246 nm)、缓冲盐 pH(3.0, 3.4)变化,在不同的耐用性色谱条件下,已知杂质、主峰与其他峰的分离度都>1.5, 且与“2.1”项下方法相比较,样品溶液所测得单个有关物质的量差值≤0.02%, 总杂差值≤0.05%, 说明此方法耐用性良好。

2.10 有关物质样品测定

取磷酸可待因 3 批中试级别的原料适量,照

“2.1”项下色谱条件进行分析,检测结果见表3,其余杂质未检出。

表3 3批中试级别样品的有关物质检测结果($n=3$)

Tab. 3 Determination results of related substances in 3 batches of pilot test samples($n=3$)

批次	杂质检测结果(%)						总杂质含量/%
	E	I	J	A	C	E	
LKS170801	0.05	0.08	0.03	0.15	0.01	ND	0.31
LKS170802	0.03	ND	0.02	0.10	0.02	ND	0.16
LKS170803	0.05	0.09	0.03	0.16	0.01	ND	0.34

注: ND-未检出。

Note: ND-not detected.

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对可待因及各杂质进行全波长扫描,从各对照品溶液的 DAD 图谱结果可知,可待因及其有关物质基本在 210 nm 附近有最大吸收,综合各国药典方法及考虑到低波长处较强的背景干扰,因此选择 EP 药典方法 245 nm 作为可待因有关物质的检测波长。

3.2 色谱条件的优化

分别尝试了 EP8.0、USP41、中国药典 2015 年版中的方法进行可待因与杂质分离度考察,其中 EP 和中国药典的方法中多种杂质间的分离度不符合要求,USP 方法中杂质 K 和 G 有重合,所以选择在 USP 方法的基础上对流动相、洗脱梯度及色谱柱有一个筛选。分别选用了 Thermo Synchronis C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Fortis Xi C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm),在 2 种色谱柱上各杂质峰形都较好,基线平稳,最终选用 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱;缓冲盐参照药典磷酸盐和庚烷磺酸钠离子对试剂,通过调节盐的浓度及梯度洗脱,最终确定用 0.2%的磷酸二氢钾和 1%的庚烷磺酸钠,磷酸调节 pH 3.2,进行梯度洗脱,主峰与各杂质间分离度良好,检测灵敏度较高,能较好地满足样品有关物质检测的要求。

3.3 杂质限度的确定

本品有紫外吸收,能用 HPLC 考察产品中的有机杂质。各杂质限度标准参考 3 版药典中最严格的执行:杂质 A 在 EP 和 USP 中限度均为 1.0%,本研究根据工艺监控结果,杂质 A 限度定为 0.5%,

样品检测符合要求;杂质 B 参照中国药典限度为 0.1%;杂质 C 和 D 参照 EP 限度为 0.2%;杂质 E 参照 USP 限度为 0.15%;杂质 H、I、J 参照 USP 限度为 0.15%;杂质 F、G 和 K 参考 ICH Q3A 和药典一般要求,设定限度为 0.1%。

3.4 有关物质测定方法的选择

采用加校正因子的主成分自身对照法计算,可以解决各成分间由于所选波长等条件造成的响应问题,能更准确地控制药品的质量。

4 结论

本实验建立了一种有效检测磷酸可待因原料药中有关物质的 HPLC,并对方法的有效性和检出能力进行了评价,该方法可以检出可待因原料药中目前已知的所有杂质,并能得到有效分离,验证结果表明该方法专属性强,灵敏度高,可以用于磷酸可待因原料药的质量检测,为本品的质量控制提供了方法,也为制剂的研究提供参考依据。

致谢:感谢部门负责合成工艺改进的师兄的辛勤工作,为分析提供所有的杂质对照品,感谢部门分析师姐在实验过程和论文撰写中的帮助,感谢合作企业在研究过程中的支持。

REFERENCES

- [1] SUN X X, GUO F X, LI J P, et al. Simultaneous determination of the related substances and preservatives in Compound codeine phosphate syrup by HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2015, 30(5): 587-589.
- [2] SOUMIA C, HANG T J. Separation and characterization of degradation/interaction products of codeine phosphate in ibuprofen arginate/codeine phosphate combination formulation by HPLC coupled with MS analysis [J]. J Chin Pharm Sci, 2014, 23(10): 694-710.
- [3] SHEN B T, JIANG H S, LI Y J. Determination of related substances of codeine codeine sustained release capsules by HPLC [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2014, 27(4): 755-758.
- [4] 宋宁宁. 高效液相色谱测定蔡普待因片中蔡普生及磷酸可待因含量[J]. 北方药学, 2014, 11(9): 18-19.
- [5] International Conference of Harmonization ICH Q2A, Text on Validation of Analytical Procedures [S]. 2005.
- [6] International Conference of Harmonization ICH Q2B, Text on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [S]. 2005.
- [7] 中国药典. 二部[S]. 2015: 1565.
- [8] European Pharmacopoeia 8.0 [S]. 2014: 1941-1942.
- [9] The United States Pharmacopoeial Convention 35 [S]. 2012: 2758-275

收稿日期: 2018-11-26

(本文责编: 蔡珊珊)