

# HPLC 测定长春西汀注射液中杂质的含量

罗 艳<sup>1</sup> 张媛媛<sup>1</sup> 刘昱虹<sup>2</sup> (通讯作者)

(1.南京海辰药业股份有限公司 江苏省南京市 210046; 2.常州市食品药品纤维质量监督检验中心 江苏省常州市 213022)

**摘要:**目的: 建立 HPLC 测定长春西汀注射液中杂质阿朴长春胺酸和长春胺酸的方法。方法: 采用色谱柱 Inertsil ODS-SP (5 μm, 4.6\*150mm), 流动相为 0.2mol/L 醋酸铵-乙腈, 梯度洗脱, 检测波长为 280nm, 柱温为 35℃。结果: 其他成分对测定无干扰。阿朴长春胺酸线性相关性良好, 检测限为 50 ng/mL, 定量限为 100 ng/mL, 平均回收率为 99.6%, 中间精密度 RSD 为 6.1%; 长春胺酸线性相关性良好, 检测限为 50 ng/mL, 定量限为 100 ng/mL, 平均回收率为 99.5%, 中间精密度 RSD 为 6.9%。结论: 本法专属性好, 准确度和精密度高。  
**关键词:** 高效液相色谱法; 长春西汀注射液; 阿朴长春胺酸; 长春胺酸

脑血管疾病多发于老年人群, 近年来发病率显著上升, 包括脑梗死、脑出血、动脉硬化等, 患者发病迅速, 致残率、死亡率、复发率高, 需积极发现导致脑血管疾病的危险因素, 关注相关疾病, 制定适当预防与治疗措施至关重要, 脑血管疾病的治疗在临床上有手术治疗和药物治疗等, 长春西汀在其治疗过程中发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>。

长春西汀 (Vinpocetine) 化学名为: (3α,16α)-象牙烯宁-14-甲酸乙酯, 由匈牙利 Gedeon Richter 公司研发并于 1978 年上市, 并在欧美许多国家上市, 在中国境内也已获进口注册批准。该物质是从长春花中得到的一种天然药物, 属吲哚类生物碱, 是生物碱长春胺的衍生物, 可通过血脑屏障, 同时增加脑部血流量, 改善脑循环, 清除氧自由基, 临床广泛用于缺血性脑血管疾病的治疗和预防, 改善脑梗塞后遗症、动脉硬化症等, 并且临床应用日益广泛, 在治疗神经系统疾病、心脏疾病方面有重要进展, 并具有抗炎、抗氧化等作用<sup>[5-9]</sup>。

在药物的合成和制备过程中, 中间体杂质是一类比较常见的杂质, 在药学研究中这一类杂质的研究和控制需要重点关注。长春西汀合成过程中较为常见的中间体有阿朴长春胺酸、长春胺酸, 由于原料药中所含杂质通常会引入制剂, 本文建立了 HPLC 法测定长春西汀注射液中阿朴长春胺酸、长春胺酸的含量, 为两种杂质的检测提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Thermo U3000 UHPLC 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); AB135-S 十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)

### 1.2 药品与试剂

对照品: 长春胺酸 (批号: 180702, 纯度: 99.5%), 阿朴长春胺酸 (批号: 180702, 纯度: 100.5%); 杂质 A (Y0000590, 欧洲药品监督管理局); 杂质 B (Y0000591, 欧洲药品监督管理局); 杂质 C (Y0000790, 欧洲药品监督管理局); 杂质 D (Y0000760, 欧洲药品监督管理局); 长春西汀对照品 (100947-201804, 中国食品药品检定研究院); 长春西汀注射液 (170801 批、170802 批、170803 批); 维生素 C (石药集团维生药业 (石家庄) 有限公司); 山梨醇 (广西南宁化学制药有限责任公司); 焦亚硫酸钠 (湖南尔康制药股份有限公司); L-酒石酸 (湖南尔康制药股份有限公司); 苯甲醇 (江苏平光制药有限责任公司); 醋酸铵 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈 (色谱纯, 默克), 水为超纯水。长春西汀、长春胺酸、阿朴长春胺酸化学名、结构式等见表 1。

表 1 长春西汀、长春胺酸、阿朴长春胺酸化学名、结构式及分子式

名称 (代号)	化学名	结构式	分子式
长春西汀	乙基 (13aS,13bS)-13a-乙基-2,3,5,6-四氢-1H-吲哚[3,2,1-de]吡啶 [3,2,1-ij][1,5]-二氮杂萘-12-羧酸		C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

长春胺酸	(4'S,12S,13aS)-13a-乙基-12-羟基-2,3,4',5,6,6a,6a',12,13,13a-八氢-1H-吲哚并[3,2,1-de]吡啶并[3,2,1-ij][1,5]茶啶-12-甲酸		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
阿朴长春胺酸	(4'S,13aS)-13a-乙基-2,3,4,1,5,6,6a,6a',13a-八氢-1H-吲哚并[3,2,1-de]吡啶并[3,2,1-ij][1,5]茶啶-12-甲酸		C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

采用 Inertsil ODS-SP (5 μm, 4.6\*150mm) 色谱柱; 以 0.2mol/L 醋酸铵为流动相 A, 以乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0min 83%A, 15min 83%A, 16min 45%A, 30min 45%A, 31min 83%A, 40min 83%A, 检测波长 280nm, 流速 1.0mL/min, 柱温 35℃, 进样体积 20μL。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 系统适用性溶液的制备

取长春胺酸、阿朴长春胺酸对照品与长春西汀对照品适量, 置于同一容量瓶中, 加流动相溶解并定量稀释制成每 1mL 含长春胺酸、阿朴长春胺酸与长春西汀各 10 μg 的混合溶液, 作为系统适用性溶液。

#### 2.2.2 专属性的制备

本品为长春西汀注射液, 根据处方量分别称取其辅料制成相当于长春西汀 1mg/mL 的溶液, 作为稀释溶液; 另分别取长春西汀对照品适量, 各已知杂质 A、B、C、D 对照品适量, 长春胺酸、阿朴长春胺酸对照品适量, 置于同一容量瓶中, 用上述稀释溶液稀释制成每 1mL 中约含各杂质 10 μg 的溶液, 作为专属性溶液。

#### 2.2.3 供试品溶液的制备

精密量取长春西汀注射液适量, 加流动相制成每 1mL 中约含长春西汀 1mg 的溶液, 作为供试品溶液。

#### 2.2.4 对照品溶液的制备

分别精密称取长春胺酸、阿朴长春胺酸, 用流动相稀释制成每 1mL 中约含长春胺酸、阿朴长春胺酸各 2 μg 的混合溶液, 作为对照品溶液。

## 3 结果

### 3.1 系统适用性

取 2.2.1 项下系统适用性溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图。结果表明, 长春胺酸、阿朴长春胺酸、长春西汀出峰时间分别为 8.160min、8.790min、31.670min, 长春胺酸、阿朴长春胺酸与长春西汀分离度良好。系统适用性图谱见图 1。

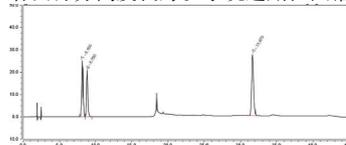


图 1 系统适用性色谱图

### 3.2 专属性试验

取 2.2.2 项下专属性溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,结果表明,主成分及各杂质均在 20min~35min 之间出峰,分离度良好,辅料对长春胺酸、阿朴长春胺酸的测定无干扰,专属性符合要求。专属性图谱见图 2。

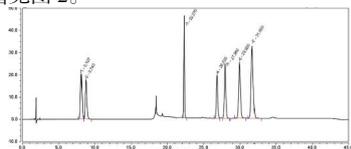


图 2 专属性试验色谱图

### 3.3 检测限和定量限

分别取长春胺酸和阿朴长春胺酸对照品适量,各精密称定,加流动相分别逐步稀释制成系列浓度的溶液,作为供试品溶液。在上述色谱条件下进样,记录色谱图。量取峰高,以峰高为噪音的三倍(即  $S/N=3$ )时的量,计算检测限,以峰高为噪音的三倍(即  $S/N=10$ )时的量,计算定量限,其中定量限浓度溶液连续进样 6 次。结果显示,长春胺酸的检测限为 50ng/mL,定量限为 100ng/mL,阿朴长春胺酸的检测限为 50ng/mL,定量限约为 100ng/mL。长春胺酸及阿朴长春胺酸定量限溶液连续进样 6 次峰面积 RSD 均小于 5%,保留时间 RSD 均小于 2%。该方法灵敏度完全符合要求。

### 3.4 线性和范围

取长春胺酸及阿朴长春胺酸适量,精密称定,用流动相溶解并定量稀释制成每 1mL 中约含长春胺酸和阿朴长春胺酸各 0.1 $\mu$ g、0.5 $\mu$ g、1 $\mu$ g、5 $\mu$ g、10 $\mu$ g 和 20 $\mu$ g 的系列浓度溶液。照 2.1 项下色谱条件进行测定。记录色谱图,量取峰面积。以色谱峰面积对质量浓度进行线性回归。结果显示,长春胺酸在 0.11~21.18 $\mu$ g/mL 浓度范围内,线性相关性良好,求得回归方程:  $y=25338x-656$  ( $r=0.9999$ ;  $n=6$ ); 阿朴长春胺酸在 0.11~21.86 $\mu$ g/mL 浓度范围内,线性相关性良好,求得回归方程:  $y=27970x+179$  ( $r=0.9999$ ;  $n=6$ )。

### 3.5 回收率试验

分别取长春胺酸和阿朴长春胺酸适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成每 1mL 中分别含长春胺酸和阿朴长春胺酸为 100 $\mu$ g 的混合溶液作为对照品溶液,精密量取长春西汀注射液 2mL,置 10mL 量瓶中,分别加入上述对照品溶液 0.5mL、1mL 和 1.5mL,加流动相稀释至刻度,摇匀,平行制成高中低浓度各 3 份样品,共 9 份。照 2.1 项下色谱条件进行测定。记录色谱图。结果显示,长春胺酸平均回收率为 99.6%,相对标准偏差(RSD)为 2.5%,阿朴长春胺酸平均回收率为 99.5%,相对标准偏差(RSD)为 1.6%,两种杂质回收率结果 RSD 均小于 3%,可知回收率结果良好。结果见表 2 和表 3。

表 2 长春胺酸回收率试验结果

测试浓度比例	加标量( $\mu$ g)	测得量( $\mu$ g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
50%	4.995	5.054	101.2	99.6	2.52
	5.010	5.116	102.1		
	5.005	5.175	103.4		
	9.990	9.976	99.9		
100%	10.020	10.009	99.9		
	10.010	9.969	99.6		
	14.985	14.279	95.3		
150%	15.030	14.811	98.5		
	15.015	14.546	96.9		

表 3 阿朴长春胺酸回收率试验结果

测试浓度比例	加标量( $\mu$ g)	测得量( $\mu$ g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
50%	5.220	5.294	101.4	99.5	1.65
	4.990	5.042	101.0		
	5.110	5.080	99.4		
100%	10.440	10.526	100.8		
	9.980	9.972	99.9		
	10.220	10.275	100.5		
150%	15.660	15.157	96.8		
	14.970	14.750	98.5		
	15.330	14.935	97.4		

### 3.6 重复性和精密度试验

分别取长春胺酸和阿朴长春胺酸对照品适量,精密称定,加流动相稀释制成每 1mL 中分别含长春胺酸和阿朴长春胺酸为 100 $\mu$ g 的混合溶液作为对照溶液,精密量取长春西汀注射液 2mL,置 10mL 量瓶中,加入上述对照溶液 1mL,加流动相稀释至刻度,摇匀,得到供试品溶液。重复测定 6 次,考察 6 个数据的相对标准偏差,作为重复性试验结果。另取长春胺酸、阿朴长春胺酸对照品和长春西汀注射液,采用不同分析仪器重复上述操作,考察两台仪器 12 各数据的相对标准偏差,作为中间精密度结果。

结果显示,本品连续测定 6 次,长春胺酸含量的相对标准偏差为 2.4%,阿朴长春胺酸含量的相对标准偏差为 2.3%,表明该方法重复性良好;两台仪器总计测定 12 次,长春胺酸含量的相对标准偏差为 3.2%,阿朴长春胺酸含量的相对标准偏差为 3.9%,表明该方法中间精密度良好。

### 3.7 耐用性试验

分别取长春胺酸和阿朴长春胺酸对照品适量,加流动相制成每 1mL 中分别含长春胺酸和阿朴长春胺酸为 100 $\mu$ g 的混合溶液作为对照溶液,精密量取长春西汀注射液 2mL,置 10mL 量瓶中,加入上述对照溶液 1mL,加流动相稀释至刻度,摇匀,得到供试品溶液。通过改变流动相流速、柱温、检测波长、流动相比例及更换色谱柱等来评估测定条件有微小变动对测定结果的影响程度,在记录的色谱图中,考察长春胺酸和阿朴长春胺酸分离度。

结果显示,柱温 30 $^{\circ}$ C 与 40 $^{\circ}$ C 条件下,长春胺酸和阿朴长春胺酸分离度分别为 2.25 和 1.99;流速 0.9mL/min 与 1.1mL/min 条件下,长春胺酸和阿朴长春胺酸分离度分别为 2.05 和 1.97;检测波长 275nm 与 285nm 条件下,长春胺酸和阿朴长春胺酸分别为 1.96 和 2.01;初始流动性比例 0.2mol/L 醋酸铵:乙腈为 85:15 与 81:19 条件下,长春胺酸和阿朴长春胺酸分离度分别为 1.87 和 2.03。柱温、流速、波长、流动相的微小变化对两个杂质的测定结果无显著性影响,该方法耐用性良好。

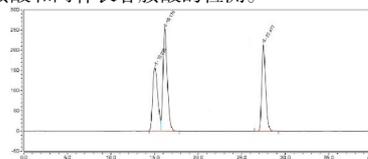
### 3.8 样品中杂质含量测定

按照 2.1 项下色谱条件,照 2.2.3 及 2.2.4 项下方法制备供试品溶液及对照品溶液,对自制 3 批长春西汀注射液中长春胺酸和阿朴长春胺酸进行检查,长春胺酸和阿朴长春胺酸含量按外标法计算。170801 批长春胺酸含量为 0.06%,阿朴长春胺酸含量为 0.01%;170802 批长春胺酸含量为 0.1%,阿朴长春胺酸含量为 0.01%;170803 批长春胺酸含量为 0.07%,阿朴长春胺酸含量为 0.01%。

### 4 讨论

#### 4.1 高效液相色谱条件的筛选和优化

长春西汀注射液暂未收录入各国药典,长春西汀原料药在美国药典及欧洲药典中均有收载,有关物质检查项下色谱条件基本一致,均对已知杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D 进行控制,但并未对长春胺酸和阿朴长春胺酸明确控制方法,在长春西汀注射液质量标准中也并未对长春胺酸和阿朴长春胺酸明确控制方法,以长春西汀注射液有关物质方法中流动相为基础进行调整,对长春胺酸和阿朴长春胺酸进行检测,发现等度条件下调整色谱条件,长春胺酸和阿朴长春胺酸的分离度仅能达到 1.2,无法满足检测需求,见图谱 3。考虑长春胺酸和阿朴长春胺酸的结构特点与极性,在长春西汀注射液有关物质色谱条件基础上对流动相进行梯度调整,考察长春胺酸和阿朴长春胺酸的分离情况,对检查方法进行筛选优化。当采用如下梯度洗脱程序时: 0min 83%A, 15min 83%A, 16min 45%A, 30min 45%A, 31min 83%A, 40min 83%A, 主成分长春西汀、各辅料峰及其他已知杂质峰与长春胺酸及阿朴长春胺酸均能达到有效的分离,其中长春胺酸及阿朴长春胺酸分离度为 2.1,且与其他各成分的分离度均远远大于 1.5,见图谱 2,该方法可满足长春西汀注射液中长春胺酸和阿朴长春胺酸的检测。



图谱 3 美国药典有关物质条件下长春胺酸和阿朴长春胺酸分离情况色谱图

#### 4.2 长春西汀注射液中长春胺酸和阿朴长春胺酸测定方法小结

本文建立了高效液相色谱法 (HPLC) 测定长春西汀注射液中长春胺酸和阿朴长春胺酸的分析方法, 所建立的检测方法灵敏度高、分离度好, 检测限、定量限、回收率及精密度等均能满足控制要求, 时检测长春西汀注射液中长春胺酸和阿朴长春胺酸较为有效的方法。采用上述建立的分析方法, 对自制长春西汀注射液三批次样品 (170801 批、170802 批、170803 批) 进行检测, 三批样品结果均符合限度要求。充分的杂质研究控制是对产品质量的保障, 由此可见, 本方法是对长春西汀注射液中有关物质检测的有效补充, 为长春西汀注射液的质量控制提供进一步的参考。

#### 参考文献:

[1]贺媛.早期康复护理应用于脑血管疾病患者的作用探讨[J].按摩与康复医学,2019,10(10):58-59.

[2]Yu Dandan,Liao Xing,Robinson Nicola, et al. 12 kinds of Chinese medicine injections for acute cerebral infarction: Protocol for a systematic review and network meta-analysis[J]. European Journal of Integrative Medicine,2019,27:75-80.

[3]Kazuhiro Ohwaki,Akira Tamura,Tomohiro Inoue,et al. Risk Factors for Cerebral Arteriosclerosis Detected by Magnetic Resonance Angiography in Brain Check-ups[J]. Ningen Dock International,

2016,4(1):28-31.

[4]刘怀志.脑血管疾病的药物治疗药物合理应用管理[J].中国卫生产业,2017,14(09):114-115.

[5]Panda Prateek Kumar, Ramachandran Aparna, Panda Pragnya, Sharawat Indar Kumar. Safety and Efficacy of Vinpocetine as a Neuroprotective Agent in Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Neurocritical care,2022.

[6]Yi-shuai Zhang,Jian-dong Li,Chen Yan. An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications[J]. European Journal of Pharmacology,2018,819.

[7]Zhang Yishuai,Li Jiandong,Yan Chen. An update on vinpocetine: New discoveries and clinical implications[J]. European journal of pharmacology,2018,819:30-34.

[8]沈永辉.长春西汀药理作用与临床应用观察[J].医学信息,2015,28(2):322.

[9]蒋金富.长春西汀临床应用研究进展[J].甘肃科技,2010,26(01):173-174.

[10]国家药典委员会.国家药品标准新药转正标准(第78册)[M].北京:中国医药科技出版社,2011:167-168.