

·国家药监局重点实验室·麻精药品质量研究专题·

中图分类号: R927.2; R971.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)03-0015-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.03.004



# 高效液相色谱法测定枸橼酸芬太尼注射液有关物质含量\*

宋文涛<sup>1</sup>, 曾令高<sup>2</sup>, 高梓真<sup>1</sup>, 王佳瑜<sup>1</sup>, 冯旭<sup>1</sup>, 许向阳<sup>1△</sup>

(1. 江苏恩华药业股份有限公司药物研究院·江苏省中枢神经药物研究重点实验室, 江苏 徐州 221000;  
2. 重庆市食品药品检验检测研究院·国家药品监督管理局麻醉精神药品质量监测重点实验室, 重庆 401121)

**专家简介:** 宋文涛, 男, 硕士, 中级工程师, 执业药师, 江苏省中枢神经药物研究重点实验室项目骨干, 从事药物分析和药品质量标准的建立、优化与提升等工作。作为主要人员参与并完成麻醉类仿制药开发项目3项, 普通口服固体制剂开发项目2项, 普通注射剂开发项目2项。



**摘要:** 目的 建立测定枸橼酸芬太尼注射液有关物质含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Shim-pack sceptor C<sub>18</sub>-120 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.01 mol/L 氯化铵溶液-乙腈(950:50, V/V)-0.01 mol/L 氯化铵溶液-乙腈(400:600, V/V), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 100 μL。结果 杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 XI 的质量浓度分别在 0.02~0.50 μg/mL、0.02~0.50 μg/mL、0.02~0.49 μg/mL、0.02~0.50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r > 0.993$ ); 检测限分别为 1.00, 1.00, 0.98, 1.00 ng, 定量限分别为 2.01, 2.00, 1.97, 2.01 ng; 重复性试验结果各杂质的 RSD 均小于 2.0% ( $n = 6$ ); 中间精密度试验结果各杂质的 RSD 均小于 3.0% ( $n = 12$ ); 平均加样回收率分别为 98.03%, 100.04%, 97.94%, 101.03%, RSD 分别为 1.61%, 1.09%, 0.98%, 1.36% ( $n = 9$ ); 2种规格(各3批)的中试样中各特定杂质及未知杂质的含量均小于 0.05% (忽略限)。结论 该方法操作简便, 专属性强, 灵敏度、耐用性好, 准确度、精密度较高, 各杂质分离度优于《中国药典》《英国药典》中的方法, 可用于枸橼酸芬太尼注射液有关物质的含量测定。拟订样品中含杂质 I、杂质 II 和杂质 XI 不得过标示量的 0.5%, 最大未知杂质不得过 0.2%, 总未知杂质不得过 0.75%。

**关键词:** 高效液相色谱法; 枸橼酸芬太尼注射液; 有关物质; 含量测定

## Content Determination of Related Substances in Fentanyl Citrate Injection by HPLC

SONG Wentao<sup>1</sup>, ZENG Linggao<sup>2</sup>, GAO Zizhen<sup>1</sup>, WANG Jiayu<sup>1</sup>, FENG Xu<sup>1</sup>, XU Xiangyang<sup>1</sup>

(1. Pharmaceutical Research Institute of Jiangsu Nwha Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Provincial Key Laboratory of Central Nervous System Drugs, Xuzhou, Jiangsu, China 221000; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances, Chongqing, China 401121)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of related substances in Fentanyl Citrate Injection. **Methods** The chromatographic column was Shim-pack sceptor C<sub>18</sub>-120 column

\*基金项目: 重庆英才计划“包干制”项目[estc2021ycjh-bgzxm0315]。

第一作者: 宋文涛, 男, 硕士, 中级工程师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)502357418@qq.com。

△通信作者: 许向阳, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中枢神经系统药物, (电子信箱)xuxiangyang@nhwa-group.com。

- [4] 张颖一, 韩廷, 汪颖, 等. 羟考酮控释片用于滴定中度癌痛的疗效观察[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(4): 52-54.
- [5] 侯轶楠, 米卫东. 盐酸羟考酮的药理作用及其在临床上的应用[J]. 感染、炎症、修复, 2016, 17(4): 251-253.
- [6] KALSO E. Oxycodone [J]. J Pain Symptom Manage, 2005, 29(5 Suppl): S47-S56.
- [7] 余小红, 吴定国, 杨金凤. 盐酸羟考酮控释片治疗癌痛疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9): 1277-1278.
- [8] 崔璨, 刘影, 康长娟. 盐酸羟考酮缓释片对急诊癌痛患者疼痛的影响及安全性[J]. 癌症进展, 2022, 20(6): 585-588.
- [9] 王羽, 周大涛, 徐佳佳. 用于检测缓释制剂中主药含量及有关物质的前处理方法: CN111999157A[P]. 2023-12-29.
- [10] 鲜亚, 郑小锋, 罗娟, 等. 磷酸可待因缓释片中主药成分的提取溶剂及提取方法: CN113155990A[P]. 2023-12-29.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 155-168.
- [12] The United States Pharmacopeia. USP 43-NF 38[M]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2020: 3335-3336.
- [13] British Pharmacopeia Commission. BP2022[M]. London: The Stationery Office, 2022: 507-509.
- [14] European Pharmacopeia Commission. EP11.0[M]. Strasbourg: European Directorate Health Care, 2022: 3608-3609.

(收稿日期: 2023-11-22; 修回日期: 2024-01-11)

(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.01 mol / L ammonium chloride solution - acetonitrile (950 : 50, V / V) - 0.01 mol / L ammonium chloride solution - acetonitrile (400 : 600, V / V) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 100 μL. **Results** The linear ranges of impurity I, impurity II, impurity III and impurity XI were 0.02 - 0.50 μg / mL, 0.02 - 0.50 μg / mL, 0.02 - 0.49 μg / mL, and 0.02 - 0.50 μg / mL ( $r > 0.993$ ), respectively. The limits of detection (LOD) were 1.00, 1.00, 0.98, and 1.00 ng, respectively. The limits of quantitation (LOQ) were 2.01, 2.00, 1.97, and 2.01 ng, respectively. The RSD of each impurity in the repeatability test was lower than 2.0% ( $n = 6$ ). The RSD of each impurity in the intermediate precision test was lower than 3.0% ( $n = 12$ ). The average recoveries of impurity I, impurity II, impurity III and impurity XI were 98.03%, 100.04%, 97.94%, and 101.03%, with RSDs of 1.61%, 1.09%, 0.98%, and 1.36% ( $n = 9$ ), respectively. The content of specific and unknown impurities in the pilot samples of two specifications (three batches each) was lower than 0.05% (disregard limit). **Conclusion** The method is simple, specific, and sensitive, with good durability, high accuracy and precision, the separation of various impurities in this method is superior to the methods in the *Chinese Pharmacopoeia* and the *British Pharmacopoeia*, it is suitable for the determination of related substances in Fentanyl Citrate Injection. The impurity I, impurity II, impurity III, and impurity XI in the samples shall not exceed 0.5% of the labeled amount, the maximum unknown impurities shall not exceed 0.2%, and the total unknown impurities shall not exceed 0.75%.

**Key words:** HPLC; Fentanyl Citrate Injection; related substances; content determination

枸橼酸芬太尼注射液为强效镇痛药,适用于麻醉前、中、后期的镇静与镇痛,是目前复合全身麻醉中的常用药物,临床用法为静脉注射、硬膜外给药及静脉滴注<sup>[1-8]</sup>,其风险远高于口服、肌肉注射等给药方式<sup>[9-10]</sup>,故应严格控制产品质量。枸橼酸芬太尼注射液法定质量标准有《中国药典》(ChP)<sup>[11]</sup>、《美国药典》(USP)<sup>[12]</sup>和《英国药典》(BP)<sup>[13]</sup>,但USP中未对有关物质进行控制,ChP中仅控制1个特定杂质(杂质I),BP中控制2个特定杂质(杂质I和杂质II)。为进一步明确枸橼酸芬太尼注射液的潜在杂质,保证用药安全,本研究中建立了测定枸橼酸芬太尼注射液有关物质含量的高效液相色谱(HPLC)法,并进行了方法学验证,旨在提升现有枸橼酸芬太尼注射液的质量标准。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);LC-20AD型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);ME403T型电子分析天平(精度为1 mg),XSE205型电子分析天平(精度为10 μg),XP6型电子分析天平(精度为1 μg),Seven Excellence型多参数测定仪,均购自瑞士Mettler Toledo公司;SHH-200GD-2型药物强光照射试验箱(重庆永生实验仪器厂);DGG-9030B型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

枸橼酸芬太尼对照品(批号为171204-201905,含量为99.9%),杂质I对照品(批号为171268-201602,含量为100.0%),均购自中国食品药品检定研究院;杂质II对照品(批号为W986640,含量为99.6%),杂质III对照品(批号为1030988,含量为98.8%),均购自英国

LGC公司;杂质XI(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为D1912161,含量为99.107%);枸橼酸芬太尼注射液(江苏恩华药业股份有限公司,规格为每支10 mL:0.5 mg,批号分别为ZA20211201, ZA20211202, ZA20211203;规格为每支2 mL:0.1 mg,批号分别为ZB20211201, ZB20211202, ZB20211203);枸橼酸、氯化铵均为分析纯,乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack sceptor C<sub>18</sub>-120柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A为0.01 mol / L氯化铵溶液-乙腈(950:50, V / V),B为0.01 mol / L氯化铵溶液-乙腈(400:600, V / V),梯度洗脱(0~7 min时30%B → 40%B, 7~25 min时40%B → 100%B, 25~40 min时100%B, 40~45 min时100%B → 30%B, 45~60 min时30%B);流速:1.0 mL / min;检测波长:210 nm;柱温:40 °C;进样量:100 μL。

### 2.2 溶液制备

空白溶液:取枸橼酸适量,加水溶解并定量稀释成每1 mL约含枸橼酸0.028 mg的溶液。

对照品溶液:取杂质I、杂质II、杂质III和杂质XI对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解,用水稀释成每1 mL约含各杂质5 μg的溶液,即得对照品贮备液;取对照品贮备液适量,加水溶解,稀释成每1 mL约含各杂质0.25 μg的溶液,即得。

系统适用性溶液:分别取枸橼酸芬太尼对照品和对照品贮备液各适量,加水溶解,稀释成每1 mL约含芬太尼50 μg、各杂质0.25 μg的溶液,即得。

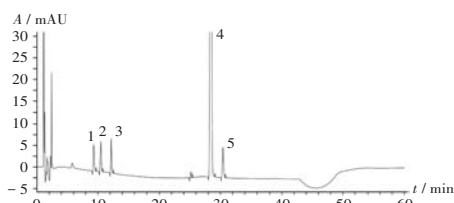
供试品溶液:取枸橼酸芬太尼注射液适量,直接作

为供试品溶液。

加样供试品溶液:取对照品贮备液0.5 mL,置10 mL容量瓶中,加供试品溶液定容,摇匀,即得

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下系统适用性溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果芬太尼及各特定杂质的色谱峰均能达到基线分离,分离良好。详见图1。



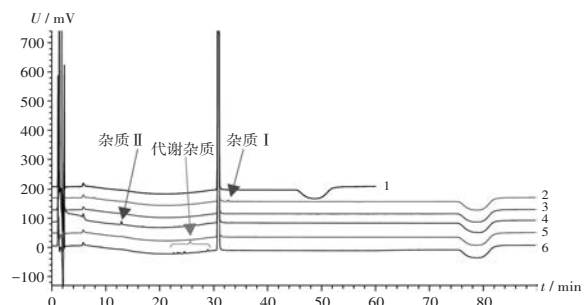
1. 杂质Ⅲ 2. 杂质Ⅺ 3. 杂质Ⅱ 4. 芬太尼 5. 杂质Ⅰ

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Impurity Ⅲ 2. Impurity Ⅺ 3. Impurity Ⅱ 4. Fentanyl  
5. Impurity Ⅰ

Fig. 1 HPLC chromatogram of the system suitability test

破坏性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别在酸(3 mol/L盐酸溶液破坏24 h)、碱(3 mol/L氢氧化钠溶液破坏24 h)、氧化(10%过氧化氢溶液破坏60 min)、高温(105 °C破坏24 h)、光照[光照强度(5 000 ± 500)lx,紫外光强度90 μW/cm<sup>2</sup>,24 h]条件下进行破坏性试验,取破坏后的供试品溶液和未破坏的供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,破坏后的供试品溶液延长有机相比例最大洗脱时间段,运行时间延长至90 min,结果见图2。可见,拟订的有关物质测定方法对枸橼酸芬太尼注射液强制降解产生的杂质均可有效分离;氧化破坏条件下,杂质Ⅱ增加;酸破坏条件下,杂质Ⅰ略有增加;光照破坏条件下,在22~30 min时会产生系列未知杂质,为芬太尼的体内代谢产物,故按非特定杂质进行控制。



1. 未破坏 2. 酸破坏 3. 碱破坏 4. 氧化破坏 5. 高温破坏  
6. 光照破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. No destroying 2. Destroyed by acid 3. Destroyed by alkali  
4. Destroyed by oxidation 5. Destroyed by high temperature  
6. Destroyed by light

Fig. 2 HPLC chromatogram of the destructive test

线性关系考察:取枸橼酸芬太尼对照品和各杂质对照品各适量,精密称定,按2.2项下方法制备系列浓度的标准曲线溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以各成分质量浓度( $C, \mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标、峰面积( $A$ )为纵坐标进行线性回归,并以主成分线性方程的斜率除以各杂质线性方程的斜率计算校正因子。结果见表1。

表1 线性关系考察、校正因子、检测限及定量限确定结果

Tab. 1 Results of the linear relation test, correction factor, LOD and LOQ

有关物质	回归方程	$r$	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	校正因子	检测限 (ng)	定量限 (ng)
杂质Ⅰ	$A = 432\,626.464\,C - 3\,872.011$	0.993 90	0.02~0.50	0.83	1.00	2.01
杂质Ⅱ	$A = 317\,573.982\,C - 672.595$	0.999 93	0.02~0.50	1.14	1.00	2.00
杂质Ⅲ	$A = 285\,910.946\,C - 433.909$	0.999 24	0.02~0.49	1.26	0.98	1.97
杂质Ⅺ	$A = 380\,610.502\,C - 346.106$	0.999 99	0.02~0.50	0.95	1.00	2.01
芬太尼	$A = 360\,622.885\,C - 393.472$	0.996 40	0.02~0.51	1.00	1.01	2.01

检测限与定量限确定:精密量取2.2项下对照品溶液适量,用水逐级稀释,以各杂质信噪比( $S/N$ ) $\geq 3$ 时的样品量为检测限,以 $S/N \geq 10$ 且连续6次进样峰面积的 $RSD \leq 10\%$ 时的样品量为定量限。结果见表1。

重复性试验:取2.2项下加样供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果各杂质的 $RSD$ 均小于2.0%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

中间精密度试验:精密量取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件,由不同试验人员在不同日期采用不同品牌的高效液相色谱仪进样检测。结果各杂质的 $RSD$ 均小于3.0%( $n=12$ ),表明方法中间精密度良好。

稳定性试验:精密量取2.2项下供试品溶液与对照品溶液各适量,分别于室温下放置0,9,18,27,36,48,60,72 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液与对照品溶液中各杂质及主峰面积的 $RSD$ 均小于1.0%( $n=8$ ),表明供试品溶液与对照品溶液在室温下放置72 h内稳定性良好。

加样回收试验:精密量取2.2项下对照品贮备液0.25,0.50,0.75 mL,置20 mL容量瓶中,加供试品溶液定容,分别作为50%,100%,150%浓度水平的加样回收试验溶液,平行3份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果见表2。

耐用性试验:取2.2项下系统适用性溶液、对照品溶液、加样供试品溶液各适量,分别在不同检测波长(208,210,212 nm)、柱温(38,40,42 °C)、流速(0.9,1.0,1.1 mL/min)、流动相盐溶液pH(9.4,9.6,9.8)、流动相比及不同批次色谱柱条件下进样测定。结果不同条件下,主峰及各杂质的分离度均大于1.5,且有关物质含量无明显差异,表明方法耐用性较好。

表2 加样回收试验结果( $n=9$ )  
Tab. 2 Results of the recovery test ( $n=9$ )

样品含量( $\mu\text{g}$ )				加入量( $\mu\text{g}$ )				测得量( $\mu\text{g}$ )				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0	0	0.13	0	2.53	2.51	2.49	2.51	2.49	2.58	2.55	2.56	98.42	102.79	97.19	101.99								
0	0	0.13	0	2.53	2.51	2.49	2.51	2.44	2.49	2.56	2.58	96.44	99.20	97.59	102.79								
0	0	0.13	0	2.53	2.51	2.49	2.51	2.52	2.52	2.52	2.59	99.60	100.40	95.98	103.19								
0	0	0.13	0	5.07	5.02	4.98	5.02	5.05	4.99	5.07	5.09	99.61	99.40	99.20	101.39								
0	0	0.13	0	5.07	5.02	4.98	5.02	4.94	5.02	5.01	5.03	97.44	100.00	97.99	100.20	98.03	100.04	97.94	101.03	1.61	1.09	0.98	1.36
0	0	0.13	0	5.07	5.02	4.98	5.02	5.03	4.99	5.03	5.05	99.21	99.40	98.39	100.60								
0	0	0.13	0	7.60	7.52	7.47	7.53	7.45	7.50	7.49	7.51	98.03	99.73	98.53	99.73								
0	0	0.13	0	7.60	7.52	7.47	7.53	7.51	7.49	7.44	7.49	98.82	99.60	97.86	99.47								
0	0	0.13	0	7.60	7.52	7.47	7.53	7.20	7.51	7.51	7.52	94.74	99.87	98.80	99.87								

注:A为杂质I,B为杂质II,C为杂质III,D为杂质XI。

Note:A refers to impurity I,B refers to impurity II,C refers to impurity III,and D refers to impurity XI.

## 2.4 样品有关物质含量测定

取样品(规格为每支10 mL:0.5 mg,批号分别为ZA20211201,ZA20211202,ZA20211203;规格为每支2 mL:0.1 mg,批号分别为ZB20211201,ZB20211202,ZB20211203),按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。按外标法以峰面积计算杂质XI含量,按外标法以对照品溶液中芬太尼校正后峰面积(分别乘以各杂质的校正因子)计算杂质I、杂质II及杂质III的含量。结果6批样品中各特定杂质及未知杂质含量均小于0.05%(忽略限)。

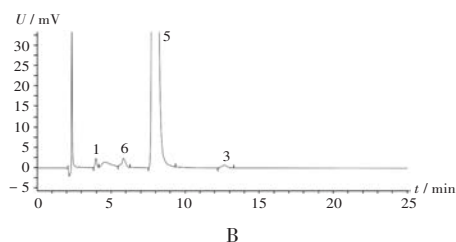
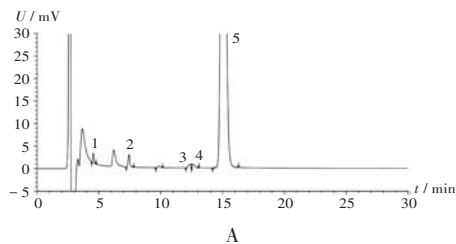
## 2.5 方法验证

取2.2项下系统适用性溶液,分别按2.1项下色谱条件、ChP色谱条件<sup>[11]</sup>、BP色谱条件<sup>[13]</sup>进样测定。结果ChP色谱条件下,杂质III在溶剂峰位置出峰,且杂质I与杂质II未达到基线分离,色谱图见图3A;BP色谱条件下,杂质I与杂质XI未达到基线分离,色谱图见图3B。按2.1项下色谱条件进样测定,主峰及各杂质峰分离度均大于1.5,分离良好。

## 3 讨论

### 3.1 制剂杂质谱分析

杂质I [ $N-(1-苯乙基-4-哌啶基)苯胺$ ]为枸橼酸芬太尼合成的中间体II,ChP标准及BP标准均将其作为已知杂质进行控制;杂质II(芬太尼氮氧化物)在氧化破坏条件下检出,为降解杂质;杂质III( $N-苯基-N-4-哌啶基丙酰胺$ )来源于枸橼酸芬太尼中间体II的合成过程,中间体I中残留的杂质哌啶酮和苯胺反应生成 $N-苯基哌啶-4-胺$ ,在后续反应中和丙酸酐反应生成杂质III,样品在光照破坏条件下亦略有检出;杂质XI( $N-苯基丙酰胺$ )为枸橼酸芬太尼中间体II中残留的苯胺和丙酸酐反应生成的产物,亦可由枸橼酸芬太尼降解产生。综合分析各杂质的来源及枸橼酸芬



1. 杂质III 2. 杂质XI 3. 杂质II 4. 杂质I 5. 芬太尼  
6. 杂质I和杂质XI  
A. ChP法 B. BP法

图3 方法验证试验高效液相色谱图

1. Impurity III 2. Impurity XI 3. Impurity II 4. Impurity I  
5. Fentanyl 6. Impurity I and impurity XI  
A. ChP method B. BP method

Fig. 3 HPLC chromatogram of the method validation test

太尼注射液后续稳定性试验检出情况,最终将杂质I、杂质II和杂质XI作为特定杂质纳入枸橼酸芬太尼注射液的质量控制标准。

### 3.2 杂质限度确定

ChP标准控制1个特定杂质(杂质I),限度为标示量的0.5%,最大未知杂质不得过0.25%,总未知杂质不得过0.75%;BP标准控制2个特定杂质(杂质I和杂质II),限度均为标示量的0.5%,最大未知杂质不得过0.25%,总未知杂质不得过0.75%。按各国药典标准中有关物质标准从严制订标准限度,结合2020年版《中国药典(四部)》9101分析方法验证指导原则<sup>[14]</sup>、人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)Q3B R2新药制剂中杂