

# 超高效液相色谱法测定硫酸吗啡及硫酸吗啡缓释片的有关物质

刘海涛<sup>#</sup>, 寇晋萍<sup>#</sup>, 侯金凤, 刘琦, 车宝泉\* (北京市药品检验研究院, 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

**摘要** 目的: 建立硫酸吗啡及其制剂杂质谱分析的超高效液相色谱法(UHPLC法)。方法: 使用 ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以 0.101% 庚烷磺酸钠溶液(用 50% 磷酸溶液调节 pH 至 2.6) 和甲醇为流动相, 梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 230 nm。结果: 本方法可实现磷酸可待因(杂质 A)、伪吗啡(杂质 B)、东罂粟碱(杂质 C)、10-羟基吗啡(杂质 D)、吗啡酮(杂质 E)、吗啡氮氧化物(杂质 F) 和 14-羟基吗啡酮(杂质 G, 基因毒性杂质) 之间及其他相邻杂质之间的良好分离, UHPLC 的使用, 大大减少了分析时间和有机溶剂甲醇的消耗量, 更为绿色环保。结论: 该方法首次将硫酸吗啡各已知杂质和 14-羟基吗啡酮在 UHPLC 条件下同时分离, 专属性良好, 并用校正因子法对原料药和制剂中的 7 个已知杂质进行准确定量, 且可同时测定硫酸吗啡原料药及其制剂硫酸吗啡缓释片中的有关物质, 为原料药的选择和制剂工艺的控制提供技术依据。

**关键词:** 硫酸吗啡; 硫酸吗啡缓释片; 超高效液相色谱法; 基因毒性杂质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)07-0807-014

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.07.011

## Determination of the Impurities in Morphine Sulfate and Morphine Sulfate Sustained-release Tablets by Ultra High Performance Liquid Chromatography

Liu Haitao<sup>#</sup>, Kou Jinping<sup>#</sup>, Hou Jinfeng, Liu Qi, Che Baoquan\* (Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China)

**Abstract Objective:** To Establish an Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) method to determine impurities in morphine sulfate and morphine sulfate sustained-release tablets. **Methods:** ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) chromatographic column was used to determine, with 0.101% sodium heptane sulfonate solution (adjusted to pH 2.6 with 50% phosphoric acid solution) and methanol as the mobile phase for gradient elution, column temperature at 35 °C, flow rate of 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, and detection wavelength of 230 nm. **Results:** This method achieved good separation between codeine phosphate (impurity A), pseudomorphine (impurity B), oripavine (impurity C), 10-hydroxymorphine (impurity D), morphine ketone (impurity E), morphine nitrogen oxide (impurity F), and 14-hydroxymorphine ketone (impurity G, genotoxic

作者简介: 刘海涛 E-mail: datoulht@sina.com

共同第一作者: 寇晋萍 E-mail: kjp@sina.com

通信作者: 车宝泉 Tel: (010) 52779629; E-mail: chebaoq\_21@163.com

impurity), as well as other adjacent impurities. The use of UHPLC greatly reduced analysis time and the consumption of organic solvent methanol, making it more green and environmentally friendly. **Conclusion:** This method is the first to simultaneously separate all known impurities of morphine sulfate and 14-hydroxymorphine ketone under UHPLC conditions with good specificity, and the correction factor method is used to accurately quantify the 7 known impurities in the API and the preparation, and the related substances in morphine sulfate and its preparation morphine sulfate sustained-release tablets can be determined at the same time, which provides a technical basis for the selection of raw materials and the control of the preparation process.

**Keywords:** morphine sulfate; morphine sulfate sustained-release tablets; UHPLC; genotoxic impurities

硫酸吗啡, 属于阿片受体激动剂, 是临床常用麻醉药品之一<sup>[1]</sup>, 广泛应用于缓解癌症晚期患者的癌痛及手术阵痛和控制慢性疼痛<sup>[2-3]</sup>, 为《麻醉药品管理条例》的品种, 其生产、销售和使用均受到严格限制<sup>[4]</sup>。近期的相关文献在考察吗啡及其制剂的质量及稳定性时仅考察了吗啡含量的变化<sup>[5-10]</sup>, 并没有关注伪吗啡、N-氧化吗啡、可待因和遗传毒性杂质。

《中华人民共和国药典》(以下称《中国药典》)2020年版(ChP 2020)<sup>[11]</sup>、美国药典(USP 43-NF37)<sup>[12]</sup>、欧洲药典 11.0版(EP 11.0)<sup>[13]</sup>和日本药典(JP 17)<sup>[14]</sup>均收录了本品的质量标准。其中ChP和USP均未设有关物质检查项, JP使用薄层色谱法测定有关物质, 英国药典(BP)和EP使用HPLC法测定伪吗啡(杂质B)、东罂粟碱(杂质C)和吗啡酮(杂质E)。14-羟基吗啡酮(杂质G)作为吗啡的基因毒性杂质, 其镇痛作用和成瘾性均远高于吗啡, 需要严格控制其含量。目前, 国内有报道使用HPLC法测定磷酸可待因(杂质A)、伪吗啡(杂质B)、东罂粟碱(杂质C)、10-羟基吗啡(杂质D)、吗啡酮(杂质E)、吗啡氮氧化物(杂质F)<sup>[15]</sup>, 分析时间较长, 需要50分钟以上, 而关于杂质G的控制方法还未见报道。

本研究建立了超高效液相色谱法(UHPLC), 能有效分离杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、杂质F和杂质G、硫酸吗啡及其相邻其他未知杂质, 且分析时间大大缩短, 并首次将硫酸吗啡中各已知杂质和14-羟基吗啡酮在UHPLC条件下同时分离, 专属性良好, 并采用加校正因子的主成分自身对照法对杂质进行定量, 从而能够更好地控制硫酸吗啡原料药及其制剂硫酸吗啡缓释片

的质量, 也为硫酸吗啡其他剂型的质量控制提供方法参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Ultimate 3000超高效液相色谱仪, 配备二极管阵列检测器、二元梯度泵、低温自动进样器, Thermo公司; XA205型十万分之一电子天平, Sartorius公司。

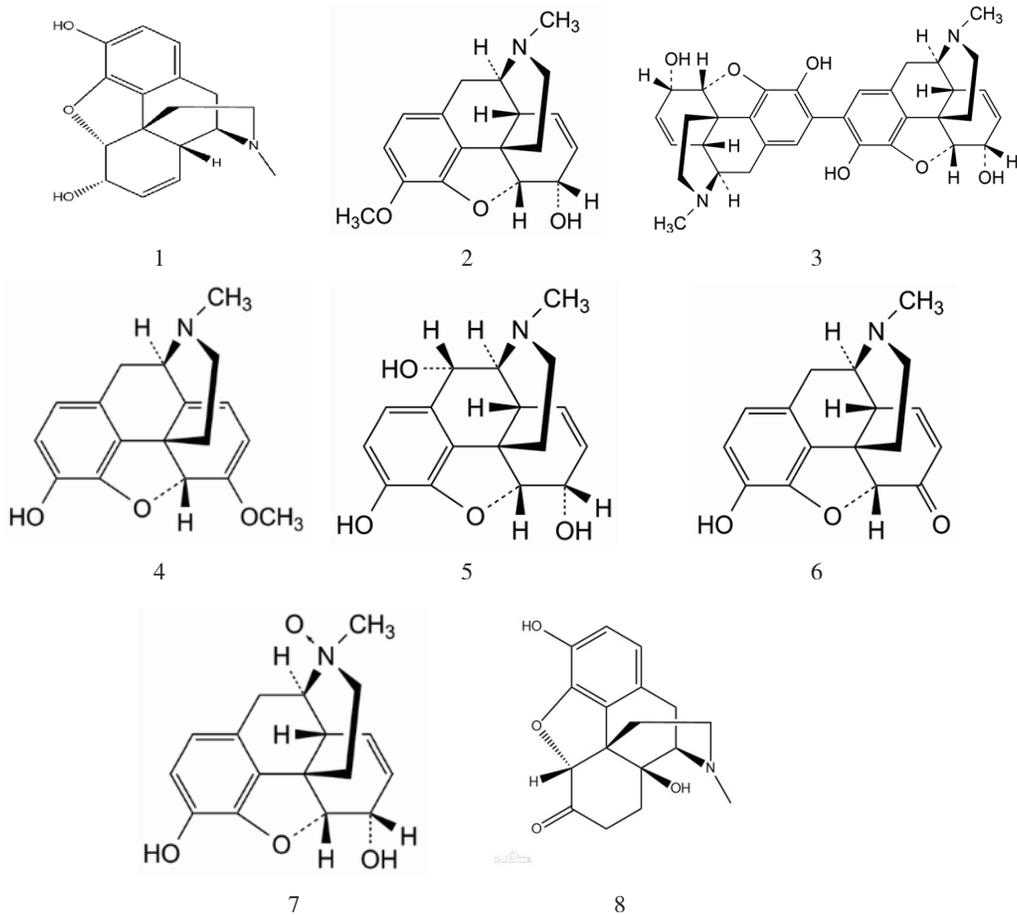
### 1.2 试药与试剂

对照品硫酸吗啡(批号: 171238-201708, 纯度: 87.3%)、杂质A(批号: 171203-201808), 均购自中国食品药品检定研究院; 杂质B(批号: STND2948)、杂质F(批号: STND3002), 均购自Bard公司; 杂质C(批号: NQS0512)、杂质D(批号: NQS1704)、杂质G(批号: NQS1008), 均购自Purisys公司; 杂质E(批号: 20190701)购自企业A; 各化合物结构见图1; 硫酸吗啡原料药来自企业A(批号: 221019)和企业B(批号: 200613); 硫酸吗啡缓释片来自企业A(批号: 220639)和企业B(批号: 2207051); 空白辅料、聚乙二醇均来自企业B; 庚烷磺酸钠为分析纯试剂, 购自J&K公司; 磷酸和醋酸均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 均购自Merk公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 0.101%庚烷磺酸钠溶液(用50%磷酸溶液调节pH至2.6)为流动相A, 甲醇为流动相B, 按表1梯度洗脱; 柱温35℃; 流速0.3 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长230 nm; 进样体积2 μL。



1. 硫酸吗啡; 2. 杂质 A; 3. 杂质 B; 4. 杂质 C; 5. 杂质 D; 6. 杂质 E; 7. 杂质 F; 8. 杂质 G。

图 1 硫酸吗啡及各杂质的结构

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	87	13
6	87	13
20	53	47
20.8	53	47
21	87	13
30	87	13

## 2.2 溶液的配制

### 2.2.1 混合对照品溶液

分别取杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、杂质F、杂质G和硫酸吗啡适量,用1%醋酸溶

液溶解并稀释制成每1 mL中含各组分约为250 μg 的对照品储备液。量取各储备液适量,用1%醋酸溶液溶解并稀释制成每1 mL中含各组分约为25 μg 的混合对照品溶液。

### 2.2.2 系统适用性溶液

称取杂质A、杂质B、杂质E、杂质F、杂质G和硫酸吗啡降解物（将硫酸吗啡对照品或原料药于105℃放置7天）适量，加1%醋酸溶液溶解并定量稀释制成每1 mL中含杂质A 6.25 μg、杂质B 12.5 μg、杂质E 2.5 μg、杂质F 2.5 μg、杂质G 1.25 μg和硫酸吗啡降解物1.25 mg的混合溶液，作为系统适用性溶液。

### 2.2.3 硫酸吗啡原料药供试品溶液

称取2个来源（企业A和企业B）的硫酸吗啡原料药62.5 mg，置50 mL量瓶中，加1%醋酸溶液30 mL，振摇10 min使溶解，用1%醋酸溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

### 2.2.4 硫酸吗啡缓释片供试品溶液

取2个来源（企业A和企业B）的硫酸吗啡缓释

片适量，研细，精密称取细粉适量（约相当于硫酸吗啡62.5 mg），置50 mL量瓶中，加1%醋酸溶液30 mL，振摇10 min使溶解，用1%醋酸溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

### 2.2.5 聚乙二醇贮备液

取聚乙二醇适量，用水溶解并稀释制成每1 mL中含聚乙二醇1 mg的溶液，作为聚乙二醇贮备液。

## 2.3 检测波长的选择

取混合对照品溶液，进样分析，使用二极管阵列检测器，记录色谱图及200~400 nm波长下的紫外光谱图，结果见表2。

综合考虑所有杂质和硫酸吗啡的紫外吸收情况，确定有关物质测定时的波长为230 nm。

表2 检测波长选择结果

样品名称	特征吸收波长及吸光度
硫酸吗啡	末端吸收，波长在230~250 nm处有吸收，285 nm处略有吸收，320 nm后无明显吸收
杂质 A	与吗啡紫外吸收相似
杂质 B	231.0 nm 处有明显吸收峰
杂质 C	与吗啡紫外吸收相似
杂质 D	与吗啡紫外吸收相似
杂质 E	与吗啡紫外吸收相似
杂质 F	与吗啡紫外吸收相似
杂质 G	与吗啡紫外吸收相似

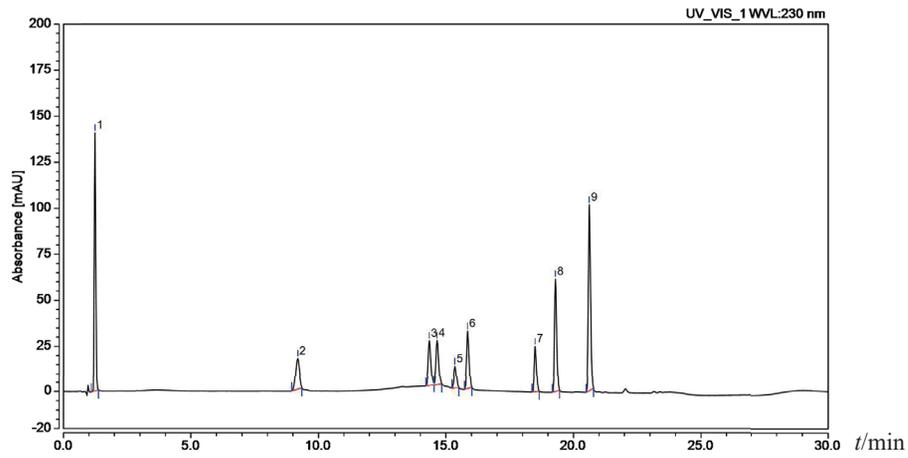
## 2.4 专属性试验

### 2.4.1 分离度试验

取混合对照品溶液和系统适用性溶液各2 μL，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。混合对照品溶液中，各色谱峰间分离度最小为1.7，系统适用性溶液中，硫酸吗啡与相邻杂质峰的分离度最小为1.6，其他色谱峰间分离度最小为2.3，分离效果良好。色谱图见图2和图3。

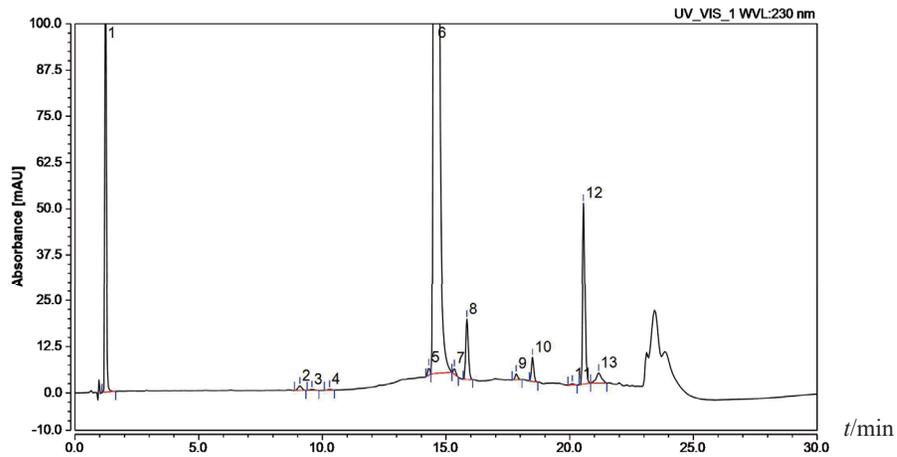
### 2.4.2 空白溶剂、空白辅料干扰试验

按“2.2.4”项硫酸吗啡缓释片供试品溶液配制方法，称取相应辅料，置50 mL量瓶中，加1%醋酸溶液30 mL，振摇10 min使溶解，用1%醋酸溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为空白辅料溶液。取空白溶剂1%醋酸溶液和空白辅料溶液各2 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，空白辅料和空白溶剂均不干扰检测。色谱图见图4和图5。



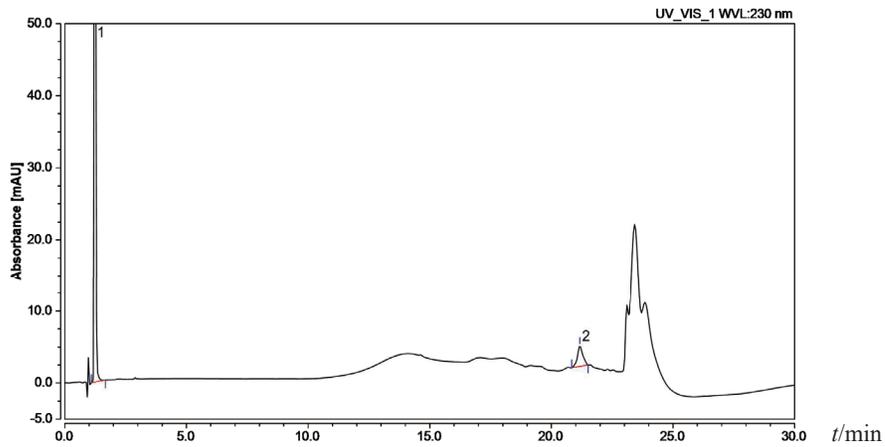
1. 醋酸; 2. 杂质 D; 3. 杂质 F; 4. 硫酸吗啡; 5. 杂质 G; 6. 杂质 E; 7. 杂质 A; 8. 杂质 C; 9. 杂质 B。

图 2 混合对照品溶液典型色谱图



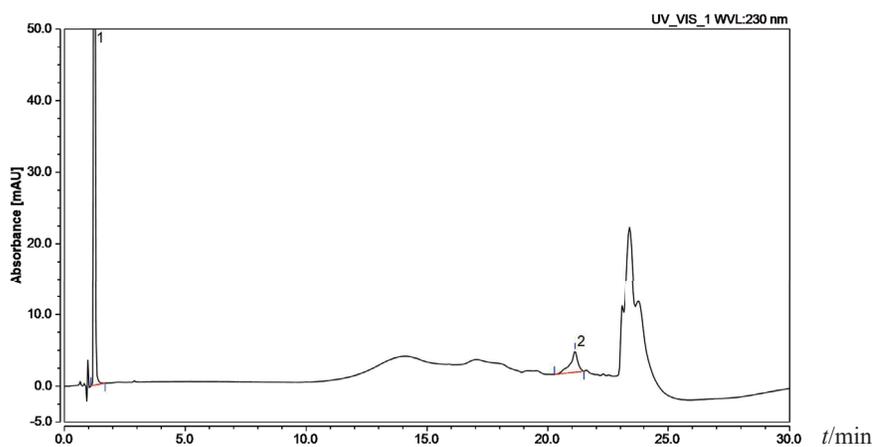
1. 醋酸; 2. 杂质 D; 3~4. 未知杂质; 5. 杂质 F; 6. 硫酸吗啡; 7. 杂质 E; 8. 杂质 G; 9. 未知杂质; 10. 杂质 A; 11. 未知杂质; 12. 杂质 B; 13. 空白溶剂。

图 3 系统适用性溶液典型色谱图



2. 空白溶剂中的未知峰。

图 4 空白溶剂典型色谱图



2. 空白溶剂中的未知峰。

图 5 空白辅料溶液典型色谱图

## 2.4.3 强制破坏试验

将硫酸吗啡原料药、硫酸吗啡缓释片在酸、

碱、氧化、高温、高湿、光照条件下进行强制破坏并检测，结果见表3和表4。

表 3 硫酸吗啡原料药强制降解试验结果

破坏条件	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	其他新降解杂质
未破坏	0.017	0.054	0.023	0.026	0.008	0.011	---
60 ℃、24 h	0.017	0.126	0.024	0.023	0.010	0.013	0.094 (RT-9.661)
RH (90 ± 5) %、5 d	0.017	0.055	0.023	0.026	0.009	0.015	0.081 (RT-9.662)
RH (90 ± 5) %、10 d	0.015	0.054	0.025	0.025	0.009	0.012	0.080 (RT-9.663)
5000 lx、24 h	0.015	0.457	0.030	0.052	0.010	0.012	0.111 (RT-9.501)
UV、24 h	0.013	0.454	0.029	0.070	0.019	0.012	0.107 (RT-9.669)
1 mol · L <sup>-1</sup> HCl、24 h	0.017	0.070	0.024	0.027	0.008	0.011	0.080 (RT-9.665)
1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH、24 h	0.016	0.077	0.022	0.014	0.008	0.010	0.086 (RT-5.123)
6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 、24 h	0.017	0.656	0.038	0.084	0.009	0.023	0.111 (RT-9.663)

表 4 硫酸吗啡缓释片强制降解试验结果

破坏条件	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	其他新降解杂质
未破坏	0.015	0.065	0.031	0.142	0.041	0.023	---
60 ℃、24 h	0.014	0.701	0.046	0.133	0.038	0.027	0.235 (RT-9.659)
RH (90 ± 5) %、5 d	0.020	0.078	0.030	0.098	0.043	0.025	0.081 (RT-9.661)
RH (90 ± 5) %、10 d	0.015	0.079	0.029	0.085	0.044	0.026	0.083 (RT-9.665)

续表 4

破坏条件	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	其他新降解杂质
5000 lx、24 h	0.125	5.905	0.099	0.620	0.030	0.022	0.115 (RT-9.509)
UV、24 h	0.025	1.647	0.064	0.346	0.031	0.021	0.192 (RT-9.659)
1 mol · L <sup>-1</sup> HCl、24 h	0.016	0.148	0.032	0.144	0.036	0.025	0.083 (RT-9.665)
1 mol · L <sup>-1</sup> NaOH、24 h	0.016	0.193	0.030	0.087	0.037	0.025	0.082 (RT-5.116)
6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 、24 h	0.019	2.164	0.067	0.354	0.034	0.039	0.187 (RT-9.661)

对破坏结果进行质量平衡计算，平衡指数均在0.95~1.05范围内，认为质量平衡符合要求。从表3和表4来看，硫酸吗啡原料药和硫酸吗啡缓释片在所设计的高湿降解条件下稳定；酸、碱降解条件下，杂质B有少量增加；氧化降解条件下，杂质B、E、G有明显增加；高温降解条件下，杂质B有明显增加、杂质F有少量增加；光照条件下，杂质B、E有明显增加且杂质D有少量增加。此色谱条件能将杂质与主峰完全分离，主峰的峰纯度合格，方法专属性强。

### 2.5 线性与范围

分别精密吸取“2.2.1”项下硫酸吗啡和各杂质对照品储备液，逐步稀释制成系列对照品溶液，分别注入液相色谱仪。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性回归。通过计算硫酸吗啡的响应值与已知杂质的响应值之间的比值，得到各已知杂质的校正因子。各成分线性结果及校正因子见表5。结果表明，硫酸吗啡以及各杂质在各自的线性范围内线性关系良好。

表 5 硫酸吗啡及各杂质标准曲线和校正因子

名称	线性范围 / ( μg · mL <sup>-1</sup> )	线性方程	相关系数	校正因子
杂质 A	0.181~18.09	y=0.1448x-0.0177	0.9999	0.69
杂质 B	0.226~22.57	y=0.4696x-0.0193	0.9999	0.21
杂质 C	0.241~24.1	y=0.2755x+0.0881	0.9994	0.36
杂质 D	0.227~22.7	y=0.1506x-0.0228	0.9998	0.66
杂质 E	0.231~23.1	y=0.2234x-0.0094	0.9999	0.44
杂质 F	0.25~25.01	y=0.1141x+0.0132	0.9999	0.87
杂质 G	0.246~24.6	y=0.4978x+0.0052	0.9999	0.20
硫酸吗啡	0.288~28.79	y=0.0993x+0.0102	0.9999	-

### 2.6 检测限和定量限

取硫酸吗啡对照品，杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质F、杂质E、杂质G对照品各适量，加1.0%醋酸溶液溶解并稀释制成每1 mL中各含0.125 mg的溶液，作为线性贮备溶液（1）。

取硫酸吗啡对照品和杂质E对照品各适量，

加1.0%醋酸溶液溶解并稀释制成每1 mL中各含0.125 mg的溶液，作为线性贮备溶液（2）。

取线性贮备溶液（1）、（2），分别逐级稀释，取稀释后溶液2 μL，进样测定，定量限和检测限汇总结果见表6、7。

表6 检测限试验结果

名称	称样量 /mg	含量 /%	折算系数 /%	稀释倍数	信噪比	检测量 /ng	相当于供试品溶液浓度 /%
硫酸吗啡	12.63	100	100	200000	4.73	0.126	0.005
杂质 A	16.87	96.9	75.34	500000	3.29	0.049	0.002
杂质 B	13.45	90.4	100	1000000	3.46	0.024	0.001
杂质 C	12.50	99.2	100	1000000	4.51	0.025	0.001
杂质 D	13.05	96.4	100	200000	3.99	0.126	0.005
杂质 E	13.62	91.4	100	1000000	4.20	0.025	0.001
杂质 F	13.57	92.2	100	200000	4.40	0.125	0.005
杂质 G	10.31	95.3	100	400000	2.5	0.049	0.005

表7 定量限试验结果

名称	称样量 /mg	含量 /%	折算系数 /%	稀释倍数	信噪比	检测量 /ng	相当于供试品溶液浓度 /%
硫酸吗啡	12.63	100	100	100000	13.99	0.253	0.010
杂质 A	16.87	96.9	75.34	200000	12.32	0.123	0.005
杂质 B	13.45	90.4	100	500000	12.36	0.049	0.002
杂质 C	12.50	99.2	100	500000	15.44	0.050	0.002
杂质 D	13.05	96.4	100	100000	16.33	0.252	0.010
杂质 E	13.62	91.4	100	500000	10.80	0.050	0.002
杂质 F	13.57	92.2	100	100000	16.21	0.250	0.010
杂质 G	10.31	95.3	100	160000	10.40	0.122	0.010

## 2.7 回收率试验

在回收率试验中,采用各已知杂质对照品加标回收试验,计算各已知杂质的回收率;采用主成分对照品加标回收试验,计算未知杂质的回收率,以此评价拟定方法的准确度。

精密称取杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、杂质F和杂质G对照品各适量,分别加1.0%醋酸溶液使溶解并稀释制成每1 mL中约含1.25 mg的溶液,作为各已知杂质的对照品贮备液。精密量取杂质A贮备液2.5 mL、杂质B贮备液5 mL、杂质C贮备液1 mL、杂质D贮备液1 mL、杂质E贮备液1 mL、杂质F贮备液1 mL和杂质G贮备液1 mL,置

同一50 mL量瓶中,用1.0%醋酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为混合已知杂质对照品贮备液。称取空白辅料以及硫酸吗啡原料药适量,精密量取混合已知杂质对照品贮备液5 mL、纯化水0.5 mL以及聚乙二醇贮备液1 mL,置同一50 mL量瓶中,加1.0%醋酸溶液30 mL,振摇10 min使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液,平行制备6份。取上述溶液各2  $\mu$ L,进样测定,记录色谱图,采用外标法以峰面积计算回收率,结果见表8。

各已知杂质回收率均在92%~105%,RSD均小于2.0%,硫酸吗啡回收率平均值为99.9%,RSD为0.8%,小于2.0%,说明方法准确度较高。

表 8 回收率试验结果

名称	供试品溶液	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
杂质 A	1	16.41	16.56	100.91	100.9	0.2
	2	16.41	16.57	100.98		
	3	16.41	16.56	100.91		
	4	16.41	16.52	100.67		
	5	16.41	16.53	100.73		
	6	16.41	16.56	100.91		
杂质 B	1	13.82	13.45	97.32	98.0	0.6
	2	13.82	13.51	97.76		
	3	13.82	13.50	97.68		
	4	13.82	13.59	98.34		
	5	13.82	13.59	98.34		
	6	13.82	13.63	98.63		
杂质 C	1	12.34	12.41	100.57	100.4	0.3
	2	12.34	12.37	100.24		
	3	12.34	12.35	100.08		
	4	12.34	12.41	100.57		
	5	12.34	12.40	100.49		
	6	12.34	12.42	100.65		
杂质 D	1	13.11	13.37	101.98	101.4	0.5
	2	13.11	13.24	100.99		
	3	13.11	13.29	101.37		
	4	13.11	13.23	100.92		
	5	13.11	13.35	101.83		
	6	13.11	13.27	101.22		
杂质 E	1	13.24	12.94	97.73	97.8	0.4
	2	13.24	13.02	98.34		
	3	13.24	12.91	97.51		
	4	13.24	12.99	98.11		
	5	13.24	12.92	97.58		
	6	13.24	12.92	97.58		

续表 8

名称	供试品溶液	加入量 /mg	测得值 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
杂质 F	1	13.96	13.29	95.20	97.0	1.3
	2	13.96	13.41	96.06		
	3	13.96	13.51	96.78		
	4	13.96	13.56	97.13		
	5	13.96	13.67	97.92		
	6	13.96	13.77	98.64		
杂质 G	1	12.31	12.22	99.27	98.8	1.0
	2	12.31	12.19	99.03		
	3	12.31	12.36	100.41		
	4	12.31	12.07	98.05		
	5	12.31	12.11	98.38		
	6	12.31	12.03	97.73		
硫酸吗啡	1	12.67	12.75	100.65	99.9	0.8
	2	12.67	12.71	100.33		
	3	12.67	12.71	100.33		
	4	12.67	12.52	98.85		
	5	12.67	12.68	100.08		
	6	12.67	12.53	98.89		

## 2.8 中间精密度试验

取硫酸吗啡缓释片供试品溶液, 由2位实验人员在不同实验日期使用不同仪器及不同色谱柱进行

试验, 每人平行制备6份, 分别测定(峰面积归一化法), 结果见表9。

表 9 中间精密度试验结果

人员及样品	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	主成分 /%	
一号 实验 员	1	0.021	0.071	未检出	0.043	0.072	0.056	0.022	99.51
	2	0.020	0.069	未检出	0.043	0.071	0.055	0.021	99.50
	3	0.020	0.070	未检出	0.041	0.071	0.055	0.022	99.50
	4	0.021	0.070	未检出	0.043	0.073	0.055	0.022	99.51
	5	0.020	0.071	未检出	0.041	0.071	0.056	0.021	99.48
	6	0.020	0.071	未检出	0.041	0.072	0.055	0.022	99.48

续表 9

人员及样品	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	杂质 D/%	杂质 E/%	杂质 F/%	杂质 G/%	主成分 /%	
二号 实验 员	1	0.021	0.071	未检出	0.041	0.071	0.056	0.021	99.50
	2	0.021	0.070	未检出	0.041	0.072	0.055	0.022	99.50
	3	0.020	0.070	未检出	0.043	0.071	0.055	0.022	99.49
	4	0.021	0.071	未检出	0.041	0.071	0.054	0.022	99.50
	5	0.020	0.070	未检出	0.043	0.072	0.056	0.022	99.48
	6	0.021	0.071	未检出	0.043	0.071	0.055	0.021	99.49
均值	0.0205	0.071	—	0.042	0.071	0.055	0.021	99.49	
RSD/%	2.5	1.0	—	2.5	0.9	1.2	2.3	0.1	

## 2.9 稳定性试验

### 2.9.1 常温下供试品溶液稳定性试验

取“2.2.4”项下供试品溶液在室温下放置，于0、2、4、6、8、10、12 h，进样考察，记录色谱图。杂质B百分含量从0.172%变化至0.408%，同时总杂质也从0.80%增加至1.80%，主峰面积有明显下降趋势。说明供试品溶液在室温下不稳定。

### 2.9.2 低温下供试品溶液稳定性试验

取“2.2.4”项下供试品溶液，在4℃下放置，于0、2、4、6、8、10、12 h，进样考察，记录色谱图。各杂质含量及杂质总量均无显著变化（各杂质含量和杂质总量偏差均小于0.05%），因此，供试品溶液应临用新制或使用低温进样器。

### 2.9.3 低温下对照品溶液稳定性试验

精密称取硫酸吗啡对照品适量，加1.0%醋酸溶液使溶解并稀释制成每1 mL中约含2.5 μg的溶液，作为对照品溶液。在4℃下放置，于0、2、

4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 h，进样考察，记录色谱图。在24 h内，主成分峰面积的RSD小于2.0%，说明对照品溶液至少在24 h内稳定。

### 2.10 耐用性试验

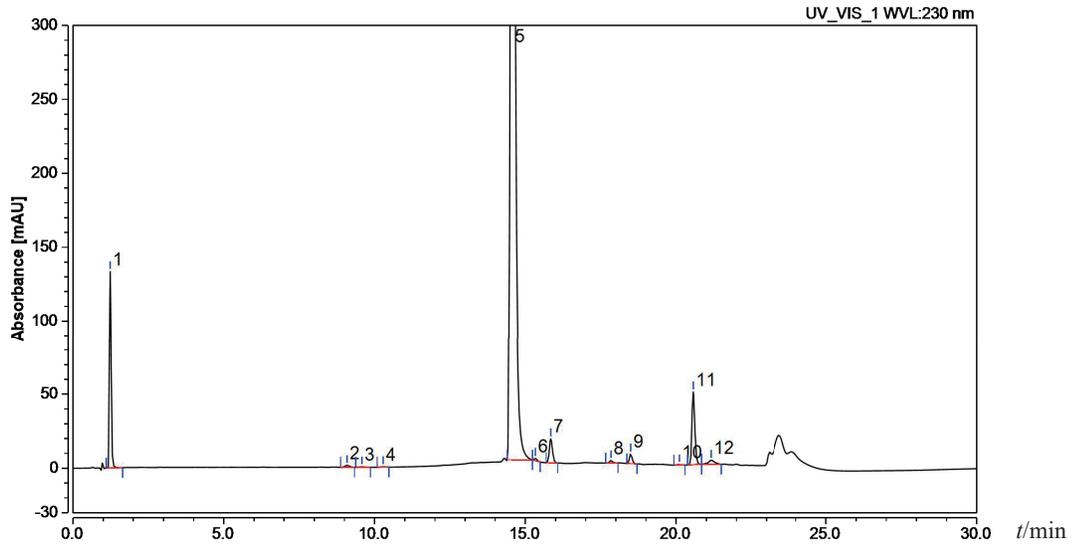
取系统适用性溶液，改变色谱条件中流速、柱温、流动相缓冲液pH、有机相比比例，以系统适用性溶液中的分离度为指标，考察该方法的耐用性。改变流速、柱温、流动相缓冲液pH以及有机相比比例，系统适用性溶液中硫酸吗啡峰与其相邻的杂质峰间的分离度均大于1.5，符合要求，说明当流速、柱温、流动相缓冲液pH以及有机相比比例等因素发生微小变化时，此方法耐用。

### 2.11 样品测定

将2批原料药和2批缓释片按照“2.2”项下方法配制成供试品溶液，进样测定，结果见表10。典型色谱图见图6和图7。

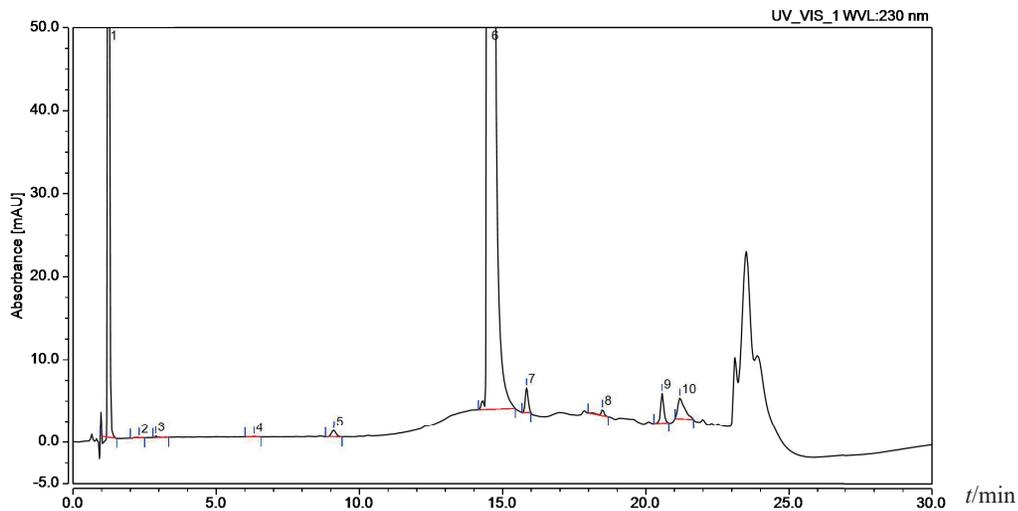
表 10 样品测定结果

样品	批号	杂质 A/ %	杂质 B/ %	杂质 C/ %	杂质 D/ %	杂质 E/ %	杂质 F/ %	杂质 G/ %	其他杂质 / %	主成分 / %
原料药	221019	0.019	0.051	未检出	0.025	0.023	0.009	0.011	0.22	99.65
	200613	0.020	0.056	未检出	0.023	0.021	0.011	0.012	0.28	99.62
缓释片	220639	0.022	0.071	未检出	0.040	0.073	0.053	0.022	0.021	99.57
	2207051	0.021	0.075	未检出	0.041	0.068	0.059	0.023	0.022	99.55



1. 醋酸; 2. 杂质 D; 3~4. 未知杂质; 5. 硫酸吗啡; 6. 杂质 E; 7. 杂质 G; 8. 未知杂质; 9. 杂质 A; 10. 未知杂质; 11. 杂质 B; 12. 空白溶剂。

图 6 硫酸吗啡原料药典型色谱图



1. 醋酸; 2~4. 未知杂质; 5. 杂质 D; 6. 硫酸吗啡; 7. 杂质 G; 8. 未知杂质; 9. 杂质 B; 10. 空白溶剂。

图 7 硫酸吗啡缓释片典型色谱图

### 3 讨论

#### 3.1 杂质B来源分析

强制破坏结果表明, 杂质B为可能降解产生的主要杂质, 是吗啡在大气氧和光的作用下, 氧化为半醌游离基, 半醌游离基与溶液中未解离的吗啡结合生成的伪吗啡, 因此吗啡在各种条件下均有可能发生降解产生杂质B。经笔者分析, 其可能降解机理见图8。

#### 3.2 杂质E和杂质F来源分析

杂质E和杂质F为硫酸吗啡原料药和硫酸吗啡

缓释片中含量较大的杂质, 其中, 杂质E是吗啡6位C原子上的羟基在大气氧及光的作用下氧化为酮的结果, 光照及氧化条件下均会发生该降解过程。经笔者分析, 其可能降解机理见图9。杂质F为吗啡17位N原子被氧化得到的吗啡氮氧化物, 氧化条件下会发生该降解过程, 高温条件下吗啡降解为杂质B同时会得到过氧化氢游离基, 也会促进该降解反应发生。经笔者分析, 其可能降解机理见图10。

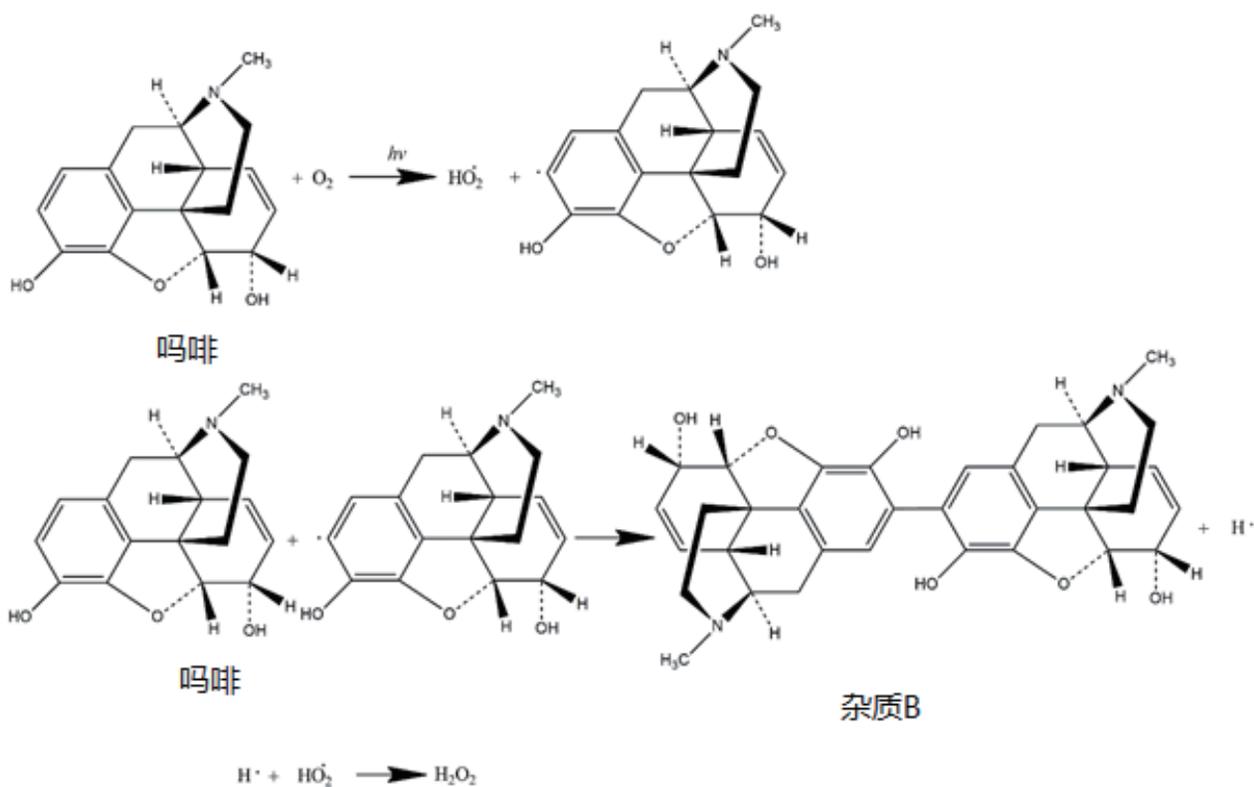


图 8 杂质 B 产生的降解机理

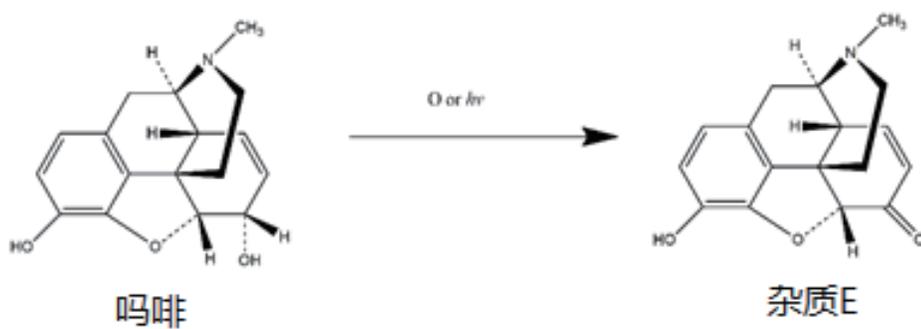


图 9 杂质 E 产生的降解机理

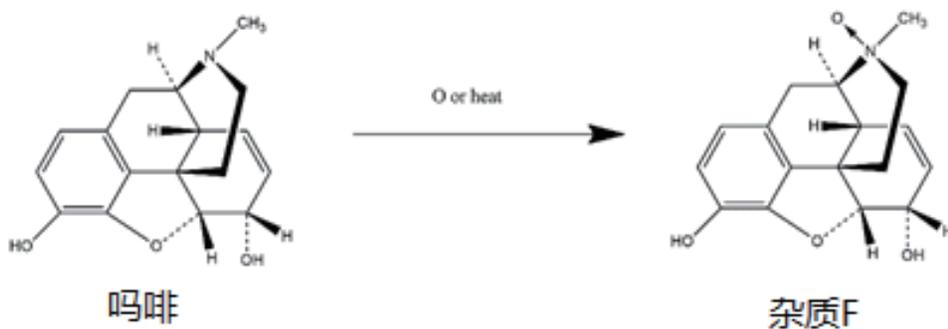


图 10 杂质 F 产生的降解机理

### 3.3 色谱柱选择

在方法选择过程中,还使用了常用的UHPLC色谱柱ACQUITY UPLC<sup>®</sup>BEH HILIC(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和ACQUITY UPLC<sup>®</sup>HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),其中,采用BEH柱时,各峰基本不保留,约3 min前杂质峰均已洗脱,不能分离;采用HSS T3柱时,硫酸吗啡峰保留时间过长,且杂质E、杂质F与硫酸吗啡不能达到基线分离。因此,本试验推荐使用ACQUITY UPLC<sup>®</sup>HSS C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱。

### 3.4 14-羟基吗啡酮

在双氢吗啡酮的14位引入羟基,即得到14-羟基吗啡酮,其镇痛作用10倍于吗啡,但成瘾性同样10倍于吗啡,因此,临床需严格控制其含量,目前企业将其作为吗啡的遗传毒性杂质来控制。

#### 参考文献:

- [1] 汤洋. 吗啡耐受和痛敏的 $\mu$ 受体机制: 伤害性感受器 $\mu$ 受体的阻断可预防耐受而不影响吗啡镇痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(8): 576.
- [2] 王天学, 张敏娟, 魏文芝, 等. 盐酸吗啡片溶出度测定方法的改进[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(6): 789.
- [3] 张博, 孙莉. 吗啡耐受机制的研究进展[J]. 北京医学, 2020, 42(3): 239.
- [4] 孟爱凤. 江苏省成人癌症疼痛护理规范(2020版)[J]. 医药高职教育与现代护理, 2020, 3(4): 229-244.
- [5] 陈惠. 临床药理学[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2018: 103.
- [6] 高文慧, 陈美华, 曹雨酥, 等. 长循环吗啡脂质体的制备及质量评价[J]. 中国药师, 2020, 23(4): 643-647.
- [7] 梁平, 侯娟, 李芮琳, 等. 盐酸吗啡注射液输液稳定性研究[J]. 中国药业, 2019, 28(6): 17-19.
- [8] 史学莲, 刘小立, 陈丽, 等. 注射器中盐酸氢吗啡酮和盐酸吗啡在不同温度下的稳定性[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(2): 103-106.
- [9] 胡蕾, 戴青, 刘芳, 等. 硫酸吗啡口腔崩解片的稳定性研究[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 515-518.
- [10] 姚晶晶, 匡钊, 丁苏苏, 等. 离子色谱法测定妥布霉素地塞米松滴眼中依地酸二钠含量[J]. 中国药业, 2021, 30(24): 78-80.
- [11] 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2020: 1573.
- [12] Morphine Sulfate [S]/ USP43-NF37, 2021.
- [13] EP 11.0[S]. 2022: 3446-3448.
- [14] JP 17[S]. 2017: 1274-1275.
- [15] 彭双, 张敏娟, 陈学艳, 等. 硫酸吗啡原料药中有关物质检查方法研究[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(13): 1112-1117.

(收稿日期 2024年1月16日 编辑 王雅雯)