

HPLC法测定注射用三磷酸胞苷二钠的含量和有关物质

张彤^{1,2*}, 周长明², 纪宏², 韩南银^{1#} (1. 北京大学药学院, 北京 100091; 2. 北京市药品检验所, 北京 100035)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0453-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.25

摘要 目的: 建立测定注射用三磷酸胞苷二钠含量和有关物质的方法。方法: 采用高效液相色谱法。以 Thermo Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱为分析柱, 以含反相离子对试剂的磷酸盐缓冲液为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 280 nm; 主药含量按峰面积以外标法计算, 有关物质含量以主成分自身对照法计算。结果: 三磷酸胞苷二钠检测质量浓度线性范围为 90~1 800 mg/L ($r=0.9997$), 平均回收率为 102.1% (RSD=1.65%, $n=9$), 定量限为 7.4 ng。结论: 本方法操作简便、灵敏度高、重复性好、专属性和耐用性较强, 可用于控制注射用三磷酸胞苷二钠的质量。

关键词 注射用三磷酸胞苷二钠; 高效液相色谱法; 有关物质; 含量测定

Content Determination and Related Substances of Cytidine Disodium Triphosphate for Injection by HPLC

ZHANG Tong^{1,2}, ZHOU Chang-ming², JI Hong², HAN Nan-yin¹ (1. School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100091, China; 2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of Cytidine disodium triphosphate for injection and related substances. METHODS: HPLC method was adopted. The Thermo Hypersil ODS C₁₈ column was used with mobile phase composed of reversed phase ion-pair reagent and phosphate buffer at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was set at 30 ℃, and the detection wavelength was set at 280 nm. The computation was performed with peak area by external standard method, and the contents of related substance were calculated by self-control method. RESULTS: The linear range of cytidine disodium triphosphate was 90-1 800 mg/L ($r=0.9997$) with an average recovery of 102.1% (RSD=1.65%, $n=9$). The limit of quantity was 7.4 ng. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and reproducible with sound specificity and reliability, and it can be used for quality control of cytidine disodium triphosphate for injection.

KEY WORDS Cytidine disodium triphosphate for injection; HPLC; Related substances; Content determination

三磷酸胞苷二钠(CTP)是核苷酸类衍生物,属于辅酶类药物,在机体内参与磷脂类及核酸的合成和代谢,是脑磷脂合成与核酸代谢的中间产物和能量来源^[1-2],对颅脑外伤后综合征及其后遗症有良好的治疗作用。注射用CTP国家标准的含量测定方法为纸电泳法^[3],该法操作烦琐、误差较大,且此标准中未对有关物质进行控制。由于CTP分子间存在高能磷酸键,注射用CTP在生产和贮存过程中很容易发生磷酸键断裂,降解成一磷酸胞苷二钠(CMP)、二磷酸胞苷二钠(CDP)等,从而对产品的质量产生影响。

笔者建立了CTP含量测定及有关物质检查的高效液相色谱(HPLC)法,结果表明该方法操作简便、灵敏度高、重复性好、专属性和耐用性较强。经方法学验证,该方法适用于CTP的质量控制。采用本方法对12个厂家的25批市售样品进行考察,结果表明不同厂家的产品质量存在较大差异。故本法也为厂家进一步从原辅料的选择、处方和工艺的优化等方面提供了较强的指导意义。

1 材料

LC-20AT型HPLC仪、SPD-M20A二极管阵列检测器、LC-solution色谱工作站(日本岛津公司);AE-240天平(瑞士

* 副主任药师。研究方向: 药物分析。电话: 010-83222411。E-mail: zhangtong74@gmail.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 010-82801590。E-mail: nanyin.han@pku.edu.cn

梅特勒-托利多公司)。

CTP对照品(芜湖华仁科技有限公司,批号:11011909,纯度:98.2%,水分:3.7%;美国Sigma公司,批号:BCBC2057,纯度:95%,水分:2.1%);CDP对照品(芜湖华仁科技有限公司,批号:11042913,纯度:98.6%,水分:2.3%);CMP对照品(美国Sigma公司,批号:070MM1493V,纯度:99.7%,水分:23.1%);注射用CTP市售样品(共12个厂家25批样品,规格:每支40 mg);四丁基溴化铵及其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二钠17.8 g、磷酸二氢钾6.8 g,加水900 ml溶解,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至7.0,加入四丁基溴化铵0.80 g,加水至1 000 ml,摇匀),流速: 1.0 ml/min;进样量: 20 μl;检测波长: 280 nm;柱温: 30 ℃。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 精密称取CTP对照品适量,用流动相定量稀释制成每1 ml中约含0.4 mg的溶液,摇匀即得。

含量测定溶液: 取样品加流动相溶解并定量稀释制成每1 ml中约含0.4 mg的溶液,摇匀即得。

有关物质检查溶液: 取样品3支,加流动相将内容物溶解并全量转移至适宜的量瓶中,加流动相定量稀释制成每1 ml中约含0.4 mg的溶液,摇匀,作为供试溶液。精密量取供试溶

液 5 ml,置于 100 ml 量瓶中,加流动相定容至刻度,摇匀,作为对照溶液。

2.3 有关物质检测方法

2.3.1 系统适用性试验。取对照品溶液进样分析,理论板数按三磷酸胞苷计不低于 3 000,三磷酸胞苷与二磷酸胞苷峰及与其相邻色谱峰之间的分离度均应 >2.0 。含量测定按峰面积以外标法计算。有关物质记录色谱图至主成分保留时间的 2 倍,以主成分自身对照法计算有关物质的量。

2.3.2 专属性试验。取样品(安徽 A 厂,批号:101112)适量(约相当于 CTP 20 mg)3 份,分别加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml、1 mol/L 盐酸 1 ml、10% 过氧化氢(H_2O_2)溶液 1 ml,室温下放置 1 h 后中和;另取样品 2 份置于 105 °C 烘箱中加热破坏 2 h 或在紫外灯下照射 1 d。分别加水定容至 50 ml,取 20 μ l 进样分析。结果表明,本品经热破坏后,产生的杂质峰均能与主峰基线分离,说明该色谱系统能有效检测 CTP 的分(降)解产物;而本品对酸、碱、氧化和光稳定。色谱见图 1。

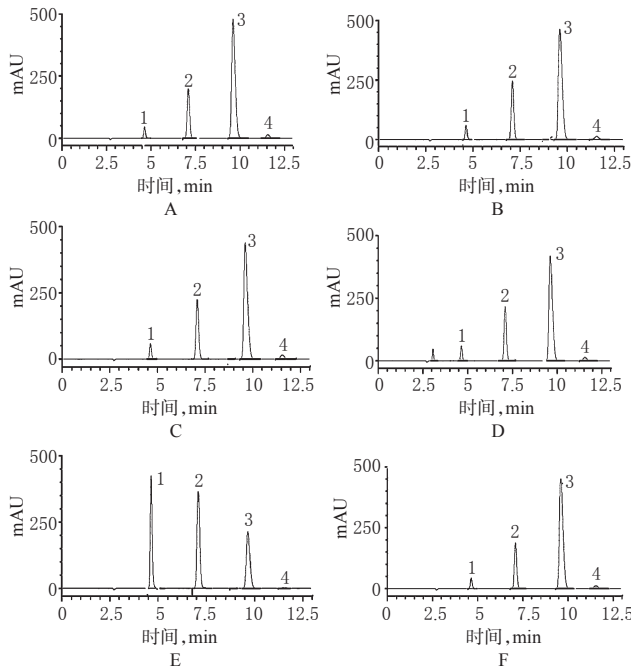


图 1 专属性试验高效液相色谱图

A. 对照品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 热破坏样品; F. 光破坏样品; 1. CMP; 2. CDP; 3. CTP; 4. 未知杂质

Fig 1 HPLC chromatograms of specificity tests

A. substance control; B. samples destroyed by acid; C. samples destroyed by alkali; D. samples destroyed by oxidation; E. samples destroyed by high temperature; F. samples destroyed by light; 1. CMP; 2. CDP; 3. CTP; 4. unknown impurity

2.3.3 响应因子测定。用国产和进口 CTP 对照品、国产 CDP 对照品及进口 CMP 对照品初步考察了 CDP 和 CMP 与 CTP 质量浓度相同时,在 280 nm 检测波长处的峰面积之比。结果表明,CTP(国产)/CDP 峰面积之比为 0.800 4,CTP(进口)/CDP 之比为 0.819 1,CTP(国产)/CMP 之比为 0.619 5,CTP(进口)/CMP 之比为 0.634 0。这与 CMP/CTP 分子质量比值 0.622 和 CDP/CTP 分子质量比值 0.811 基本一致。

2.3.4 定量限。根据测试溶液质量浓度和进样体积计算,CTP 定量限(信噪比为 10)为 7.4 ng,CDP 定量限(信噪比为 10)为 1.08 ng,CMP 定量限(信噪比为 10)为 0.21 ng。

2.4 含量测定方法

2.4.1 线性关系。精密称取进口 CTP 对照品约 0.45 g,置于 200 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,再精密量取 5 ml,分别置于 10、25、50、100 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得质量浓度分别为 1 860、930、372、186、93 mg/L 的对照品溶液。精密量取上述 5 种溶液各 20 μ l 进样分析,记录色谱图。以质量浓度(c , mg/L)对峰面积(A)进行回归,得回归方程 $A=9.724 \times 10^3 c + 2.156 \times 10^5$ ($r=0.999 7, n=5$),表明 CTP 检测质量浓度线性范围为 90~1 800 mg/L。

2.4.2 精密度的试验。取质量浓度约为 400 mg/L 的对照品溶液,连续进样 6 次。结果,其峰面积的 RSD=0.28% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.4.3 重复性试验。取同一批样品,测定 6 次,结果平均含量 101.0%,RSD=1.4% ($n=6$)。

2.4.4 稳定性试验。精密量取进口 CTP 对照品溶液,在室温下经 3、5、8、19、25 h 放置后分别进样。结果 RSD=0.9% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置 25 h 内稳定。

2.4.5 回收率试验。精密量取对照品溶液(约 1 000 mg/L) 3、4、5 ml 各 3 份,分别置于 10 ml 量瓶中,加处方量的辅料溶液稀释至刻度。按含量测定方法,精密量取上述溶液各 20 μ l 进样分析,记录色谱图,计算回收率。结果,平均回收率为 102.1%,RSD=1.65% ($n=9$),详见表 1。

表 1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=9$)				
测得量,mg	加入量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
278.9	278.7	99.93		
278.9	279.4	100.18		
278.9	277.8	99.62		
371.9	383.6	103.13		
371.9	383.6	103.16	102.1	1.65
371.9	384.2	103.30		
464.9	482.3	103.73		
464.9	476.4	102.47		
464.9	480.6	103.37		

2.4.6 耐用性试验。取同一批样品,采用不同厂牌 4 种色谱柱测定,评价系统适用性相关指标。结果,CTP 理论板数均 $>3 000$,其中 3 种色谱柱 CTP 与 CDP 分离度 >2.0 。

2.5 样品测定

取各市售样品,按“2.2”项下方法制备成含量测定样品溶液,同时取不含 CTP 的辅料同法制备成空白溶液及进口 CTP 对照品溶液,在“2.1”项下色谱条件依法测定,记录色谱图见图 2(图 2 为安徽 A 厂产品,批号:101112);含量和有关物质测定结果见表 2。

3 讨论

3.1 25 批样品考察结果分析

根据国家药典委员会 2010—2011 年度国家药品标准提高工作的相关要求,需对注射用 CTP 的质量标准进行补充与提高工作。目前国内该品种共有 31 个批准文号,最终收集到 12 家企业的 25 批样品。笔者根据原质量标准建立了含量和有关物质测定方法及考察了其方法学,并利用建立的方法对 25 批市售产品进行了质量考察和对比,结果发现注射用 CTP 主要市售产品间主成分含量和有关物质含量均存在显著性差异。

3.2 流动相的考察

文献^[4-6]报道常用的流动相为水相或水相与有机相甲醇混合。笔者在前期试验中对多种流动相进行了比较,结果发现

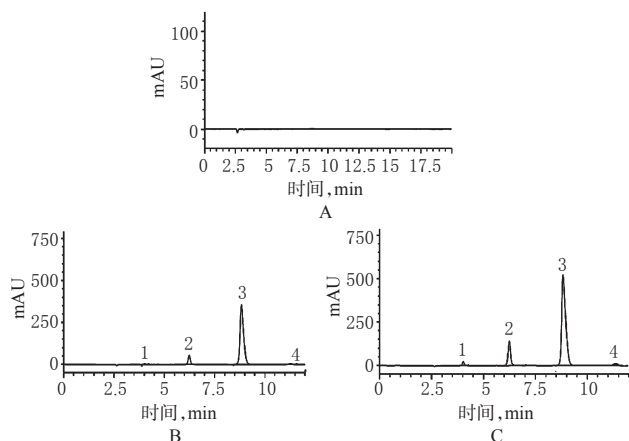


图2 含量测定高效液相色谱图

A.空白; B.对照品; C.样品; 1.CMP; 2.CDP; 3. CTP; 4.未知杂质

Fig 2 HPLC chromatograms of content determination

A. blank; B. substance control; C. samples; 1. CMP; 2. CDP; 3. CTP; 4. unknown impurity

表2 25批样品含量和有关物质测定结果

Tab 2 Results of content and related substance determination of 25 batches of samples

生产厂家	批号	有关物质含量, %	主成分含量, %
安徽A	101112	CMP: 3.4, CDP: 24.2, 杂质总量: 30.6	144.3
天津B	10120503	CMP: 1.4, CDP: 18.9, 杂质总量: 21.9	98.4
	10072103	CMP: 1.0, CDP: 15.5, 杂质总量: 17.7	100.9
	09111903	CMP: 1.1, CDP: 14.2, 杂质总量: 16.9	107.3
浙江C	20110310	CMP: 2.0, CDP: 22.2, 杂质总量: 25.6	114.3
	20100325	CMP: 8.9, CDP: 46.0, 杂质总量: 57.3	91.2
珠海D	13511001	CMP: 0.2, CDP: 7.2, 杂质总量: 7.9	130.6
	13510004	CMP: 0.3, CDP: 7.6, 杂质总量: 8.5	123.3
	13410010	CMP: 0.2, CDP: 7.3, 杂质总量: 8.2	127.7
	13409008	CMP: 1.6, CDP: 18.8, 杂质总量: 23.0	114.6
山东E	0909178	CMP: 2.0, CDP: 20.1, 杂质总量: 23.5	100.7
	1102238	CMP: 1.7, CDP: 19.7, 杂质总量: 22.4	96.3
	1101228	CMP: 2.5, CDP: 25.1, 杂质总量: 29.2	96.3
北京F	20110122	CMP: 3.8, CDP: 40.6, 杂质总量: 46.1	99.5
山东G	1101182-4	CMP: 1.9, CDP: 19.3, 杂质总量: 23.5	104.8
陕西H	20101114-A	CMP: 6.3, CDP: 36.3, 杂质总量: 46.1	117.5
吉林I	20110101	CMP: 4.7, CDP: 28.0, 杂质总量: 37.7	100.2
	20110301	CMP: 2.9, CDP: 19.1, 杂质总量: 25.9	102.1
	20110102	CMP: 3.7, CDP: 23.8, 杂质总量: 31.8	98.9
海南J	20110601-1	CMP: 1.9, CDP: 16.6, 杂质总量: 21.1	97.0
	20110501	CMP: 1.6, CDP: 14.8, 杂质总量: 18.6	94.3
黑龙江K	20110501	CMP: 0.8, CDP: 13.6, 杂质总量: 15.4	121.8
	20110309	CMP: 0.2, CDP: 5.7, 杂质总量: 6.7	147.0
	20110308	CMP: 未测出, CDP: 4.7, 杂质总量: 5.4	141.8
成都L	110901(II)	CMP: 6.1, CDP: 44.4, 杂质总量: 60.5	97.9

在水相中加入甲醇会使主峰保留时间缩短。水相多采用磷酸盐缓冲液,用氢氧化钠或三乙胺调节pH值。pH升高会延长主峰保留时间,有利于分离,普通液相色谱柱的pH使用高限为7。在流动相中加入一定量的离子对试剂四丁基溴化铵可改善分离度。磷酸盐浓度和离子对试剂浓度均对主峰保留时间有一定影响,通常较高的盐浓度能缩短主峰保留时间,而增加离子对试剂浓度可改善分离度。经过对不同流动相所记录色谱图的综合分析与比较(保留时间、峰形、理论板数、分离度),最终确定采用本法中的流动相。

3.3 检测波长的确定

本试验采用二极管阵列检测器,所以可以方便地得到供试品的紫外图谱。在试验中发现,CTP在280 nm波长处有最大吸收,CMP和CDP均在279 nm波长有最大吸收,并且空白溶液在280 nm波长处无紫外吸收,因此确定280 nm为本试验的检测波长。

3.4 定量方法的确定

CTP含量测定的方法文献报道很多。其中包括地标升国标(第16册)^[3]的纸电泳法。纸电泳法操作烦琐,手动点样准确度低,且试验过程中干扰测定结果的因素较多,最终造成结果的重现性较差。另外也有采用HPLC法利用经典公式计算CTP的质量比(%),再结合紫外吸收系数法测定总核苷酸(即CTP、CMP和CDP及其他可能存在的核酸类成分的总量),最终计算得到CTP含量^[7-10]。此方法不使用CTP对照品,主要是考虑CTP对照品一般纯度不高,多含CMP和CDP等有关物质,并具有较强的引湿性,且对温度敏感,需低温保存。另外在计算CTP的质量比的公式中使用的0.655和0.848分别作为CMP和CDP的折算系数,但在采用不同对照品的实际测定结果显示与此数值有差异。考虑到工艺和保存条件等的提高,对照品法是更加简易可行的方法。

本方法也同样适用于注射用CTP中有关物质的检查。在保证主成分与有关物质峰的良好分离下,同时满足为缩短试验周期对运行时间的需要,采用自身对照法定量测定有关物质。由于CDP和CMP紫外响应高于CTP,所以实际含量低于给出的结果,但不影响不同厂家间产品的质量评价。

综上所述,本试验方法操作简便、快速、专属性强、灵敏度高、重复性和耐用性好、结果准确,与原标准比较能够更好地控制产品的质量。本文的有关物质测定结果对有关生产企业加强原辅料质量控制、改进工艺并通过稳定性试验考察制订更加合理的贮藏条件和效期具有较强的指导意义。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.关于修订三磷酸胞苷二钠制剂说明书的通知[S].2006-02-22.
- [2] 郭瑞芳,李英平,李玉臣,等.三磷酸胞苷二钠对脑缺血大鼠海马CA3区突触体素表达的影响[J].中风与神经疾病杂志,2003,20(6):529.
- [3] 国家食品药品监督管理局.化学药品地方标准上升国家标准:16册[S].2003:270-272.
- [4] 国家食品药品监督管理局.YBH21632004 三磷酸胞苷二钠注射液[S].2004.
- [5] 国家食品药品监督管理局.YBH25922005 三磷酸胞苷二钠注射液[S].2005.
- [6] 历文霞,苏云明,李国辉.HPLC法测定三磷酸胞苷二钠氯化钠注射液的有关物质[J].中国药师,2010,13(4):529.
- [7] 国家食品药品监督管理局.YBH10172006 注射用三磷酸胞苷二钠[S].2006.
- [8] 国家食品药品监督管理局.YBH24542006 注射用三磷酸胞苷二钠[S].2006.
- [9] 国家食品药品监督管理局.YBH24472006 注射用三磷酸胞苷二钠[S].2006.
- [10] 国家食品药品监督管理局.YBH04792008 注射用三磷酸胞苷二钠[S].2008.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-04-20)