

# RP-HPLC法测定注射用磷酸肌酸钠有关物质的含量

郭兴辉<sup>1\*</sup>, 王倩雯<sup>2</sup>(1.河南省食品药品检验所, 郑州 450000; 2.中山大学药学院, 广州 516000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)09-0840-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.09.26

**摘要** 目的:建立测定注射用磷酸肌酸钠中有关物质(包括已知杂质肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐和其他未知杂质)含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters C<sub>18</sub>, 流动相为 0.005 mol/L 四丁基磷酸氢铵溶液, 二极管阵列检测器, 检测波长为 210 nm。结果:磷酸肌酸钠峰与相邻杂质峰能完全分离, 磷酸肌酸钠中肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐检测质量浓度线性范围分别为 10~125( $r=0.9999$ )、10~125( $r=0.9999$ )、20~250( $r=0.9999$ )  $\mu\text{g/ml}$ , 平均回收率分别为 100.9%、99.2%、99.8%, RSD 分别为 1.3%、1.2%、0.8%, 肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐、磷酸肌酸钠定量限分别为 1.0、0.5、1.5、1.0 ng。结论:该方法灵敏度高、专属性强, 可用于注射用磷酸肌酸钠中有关物质的质量控制。

**关键词** 注射用磷酸肌酸钠; 反相高效液相色谱法; 有关物质; 检查

## Content Determination of Related Substances in Creatine Phosphate Sodium for Injection by RP-HPLC

GUO Xing-hui<sup>1</sup>, WANG Qian-wen<sup>2</sup>(1.Henan Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450000, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 516000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of related substances in Creatine phosphate sodium for injection, including known impurity creatine, creatinine, creatinine phosphate and other unknown impurities. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.005 mol/L tetrabutyl ammonium hydrogen phosphate. The PDA detection wavelength was set at 210 nm. RESULTS: The creatine phosphate sodium was well separated from other impurities. The linear ranges of creatine, creatinine and creatinine phosphate were 10-125  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.9999$ ), 10-125  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.9999$ ) and 20-250  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.9999$ ). The average recoveries were 100.9% (RSD=1.3%), 99.2% (RSD=1.2%) and 99.8% (RSD=0.8%), respectively. The limits of quantification were 1.0, 0.5, 1.5 and 1.0 ng. CONCLUSIONS: The method is proved to be sensitive, specific and suitable for the quality control of related substances in Creatine phosphate sodium for injection.

**KEY WORDS** Creatine phosphate sodium for injection; RP-HPLC; Related substance; Determination

表3 样品测定结果(%,  $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of samples(%,  $n=3$ )

溶剂	批号			规定限量
	201001	201002	201003	
丙酮	-	-	-	0.5
甲醇	-	-	-	0.3
异丙醇	0.124 4	0.109 0	0.121 8	0.5
甲苯	-	-	-	0.089
吡啶	0.007 1	0.007 8	0.006 4	0.02

残留溶剂多为挥发性溶剂, 在原料药中含量较低, 而且由于气相色谱法进样量小, 因此相比外标法而言, 内标法可以减少仪器或操作带来的误差。笔者经过前期试验筛选, 选择三氯甲烷为本试验的内标物, 其与各待测溶剂均能达到良好分离。

甲磺酸伊马替尼易溶于水, 但是水直接进样对毛细管柱损害较大, 因此考虑选用有机溶剂。本试验中 5 种待测溶剂的沸点差异较大, 最低的丙酮为 56  $^{\circ}\text{C}$ , 最高的吡啶为 115.3  $^{\circ}\text{C}$ , 而且极性差异也较大。考虑到原料药的溶解性和溶剂之间的

分离度, 选择沸点更高的 DMSO(153  $^{\circ}\text{C}$ ) 为溶剂。

本研究建立的气相色谱法可同时测定 5 种有机溶剂残留量, 且方法操作简便、重复性好, 各方法学考察试验中的 RSD 均小于 5%, 结果准确可靠。

## 参考文献

- [1] 王晨. 甲磺酸伊马替尼抗肿瘤作用的研究[J]. 天津药学, 2005, 17(4): 63.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 686. 附录 61-65.
- [3] 陈立亚, 于宝珠, 赵慧芳. ICH 指导原则与各国现行药典药品的残留溶剂分析方法概述[J]. 中国药事, 2005, 19(9): 542.
- [4] 李春燕, 屠婕红, 傅应华. 毛细管气相色谱法同时检测丙酸氯倍他索原料药中 4 种有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2011, 22(29): 2 756.
- [5] 吴春丽, 雷伟, 李幸, 等. GC 法检测氟康唑原料药中的有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2011, 22(25): 2 390.

(收稿日期: 2012-04-10 修回日期: 2012-04-23)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0371-63388290。  
E-mail: Tinaguoxh@126.com

磷酸肌酸钠是一种心肌保护剂,临床上用于治疗横纹肌活性不足,是心肌疾病的辅助治疗药物<sup>[1]</sup>。2010年版《中国药典》二部未收载该原料药及制剂,其质量标准收载于进口药品质量标准中,且仅对其总杂质的量进行了控制,在其他文献中未见有关磷酸肌酸钠有关物质的报道。为更好地控制药品质量,本文建立了反相(离子对)高效液相色谱(RP-HPLC)法测定注射用磷酸肌酸钠中已知杂质肌酸、肌酸酐和磷酸肌酸酐的含量。经方法学考察,线性关系良好、专属性好、回收率满意,且操作快速、结果准确,同时对其他有关物质也进行了控制<sup>[2]</sup>。表明所建立的方法适用于该原料药合成及制剂分装前生产过程中的质量控制。

## 1 材料

2695 HPLC 仪、2996 二极管阵列检测器(PDA)、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);AE-240 电子分析天平(上海梅特勒-托利多公司)。

注射用磷酸肌酸钠(由某公司提供,批号:20111211、20111221、20111231,规格:每瓶 0.5 g);肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐、磷酸肌酸钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为:100876-200901、100877-200901、C1413、100875-200901,纯度分别为:99.7%、99.2%、97.8%、76.2%);四丁基磷酸氢铵为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.005 mol/L 四丁基磷酸氢铵溶液(取四丁基磷酸氢铵 1.7 g,加水 900 ml 使溶解,用 20% 磷酸钠调节 pH 值至 7.0,用水稀释至 1 000 ml),流速:1.0 ml/min;溶剂:水;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。理论板数按磷酸肌酸钠峰计为 7 854。

### 2.2 空白试验

注射用磷酸肌酸钠由磷酸肌酸钠原料药无菌分装制成,没有辅料添加,因此,取有关物质测定时溶解样品的溶剂 10 μl,按上述色谱条件进样测定。结果溶剂不干扰样品中肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐和其他有关物质的测定,见图 1。

### 2.3 肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐线性关系考察

取肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐对照品适量,精密称定,加水制成含肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐 50、50、100 μg/ml 的混合溶液,分别稀释成不同质量浓度(肌酸、肌酸酐为 10、25、50、75、100、125 μg/ml,磷酸肌酸酐为 20、50、100、150、200、250 μg/ml)溶液注入色谱仪,记录色谱图。以质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行回归,得回归方程分别为:肌酸: $y=915.69x+5.6519$ ( $r=0.9999$ , $n=5$ );肌酸酐: $y=2664.5x-4.7182$ ( $r=0.9999$ , $n=5$ );磷酸肌酸酐: $y=1117.6x+4.8245$ ( $r=0.9999$ , $n=5$ )。结果表明,肌酸、肌酸酐检测质量浓度线性范围为 10~125 μg/ml;磷酸肌酸酐检测质量浓度线性范围为 20~250 μg/ml。

### 2.4 检测限和定量限

取“2.3”项下的混合溶液及磷酸肌酸钠对照品溶液稀释后进样,当信噪比为 3:1 时,肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐、磷酸肌酸钠检测限分别为 0.5、0.25、2.0、0.5 ng;当信噪比为 10:1 时,定量限分别为 1.0、0.5、1.5、1.0 ng。

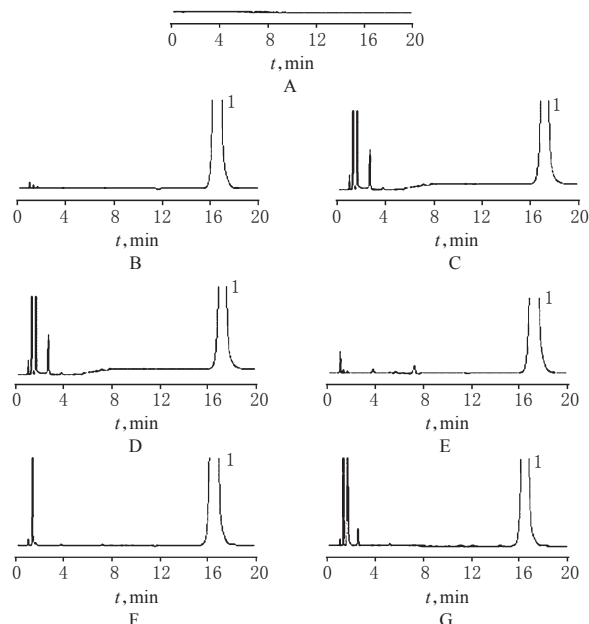


图 1 磷酸肌酸钠专属性试验高效液相色谱图

A. 溶剂; B. 未经破坏样品; C. 酸破坏样品; D. 碱破坏样品; E. 高温破坏样品; F. 氧化破坏样品; G. 光破坏样品; 1. 磷酸肌酸钠

Fig 1 HPLC chromatograms of specificity test of creatine phosphate sodium

A. solvent; B. undestroyed samples; C. samples destroyed by acid; D. samples destroyed by alkali; E. samples destroyed by high temperature; F. samples destroyed by oxidation; G. samples destroyed by high light; 1. creatine phosphate sodium

### 2.5 精密度和稳定性试验

取“2.3”项下混合溶液,重复进样 6 次,以峰面积计算 RSD,结果分别为肌酸:0.33%,肌酸酐:0.17%,磷酸肌酸酐:0.61%,表明该方法精密度良好。取上述溶液,在 2~8 ℃ 温度条件下,分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样,测定肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐峰面积,结果 RSD 分别为 0.60%、0.88%、1.32%,表明混合溶液在 2~8 ℃ 温度条件下 10 h 内基本稳定。

### 2.6 回收率试验

取供试品(批号:20111211)约 50 mg,共 9 份,精密称定,分别加入肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐混合溶液(500、500、1 000 μg/ml)0.8、1.0、1.2 ml 各 3 份,置于 10 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;取 10 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图,外标法计算含量及回收率。结果,肌酸的平均回收率为 100.9%,RSD=1.3%;肌酸酐平均回收率为 99.2%,RSD=1.2%;磷酸肌酸酐平均回收率为 99.8%,RSD=0.8%。表明该方法准确度良好,基本满足肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐的测定要求,详见表 1、表 2、表 3。

### 2.7 专属性试验

取供试品(批号:20111211)约 50 mg,共 6 份,进行不同条件下的降解试验,试验条件分别为:(1)未经破坏;(2)酸破坏:加入 0.1 mol/L 的盐酸溶液 2 ml,室温放置 20 min 后用碱中和;(3)碱破坏:加入 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 2 ml,室温放置 20 min 后用酸中和;(4)高温破坏:样品在 120 ℃ 烘箱中放置 1 h;(5)氧化破坏:加入 30% 的双氧水 0.5 ml,室温放置 20 min;(6)光破坏:在 1 500 lx 的强光下照射 12 h。以上样品均用水溶解

表1 肌酸回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test of creatine(n=9)

样品中杂质质量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
0.012 5	0.396 8	0.401 3	97.98		
0.012 5	0.396 8	0.403 5	98.54		
0.012 5	0.396 8	0.408 2	99.72		
0.012 5	0.496 0	0.515 8	101.47		
0.012 5	0.496 0	0.497 7	97.82	100.9	1.3
0.012 5	0.496 0	0.496 5	97.58		
0.012 5	0.595 2	0.606 9	99.87		
0.012 5	0.595 2	0.597 3	98.25		
0.012 5	0.595 2	0.598 4	98.44		

表2 肌酸酐回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test of creatinine(n=9)

样品中杂质质量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
0.011	0.401 6	0.402 5	97.49		
0.011	0.401 6	0.403 8	97.81		
0.011	0.401 6	0.410 1	99.38		
0.011	0.502 0	0.503 3	98.07		
0.011	0.502 0	0.509 8	99.36	99.2	1.2
0.011	0.502 0	0.510 2	99.44		
0.011	0.602 4	0.616 0	100.43		
0.011	0.602 4	0.609 8	99.40		
0.011	0.602 4	0.620 1	101.11		

表3 磷酸肌酸酐回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery test of creatinine phosphate(n=9)

样品中杂质质量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
0.003 8	0.848 0	0.865 9	101.66		
0.003 8	0.848 0	0.841 4	99.78		
0.003 8	0.848 0	0.848 1	99.57		
0.003 8	1.060 0	1.062 3	99.86		
0.003 8	1.060 0	1.058 2	99.47	99.8	0.8
0.003 8	1.060 0	1.053 5	99.03		
0.003 8	1.272 0	1.272 2	99.72		
0.003 8	1.272 0	1.281 2	100.43		
0.003 8	1.272 0	1.275 1	99.95		

制成5 mg/ml的溶液,摇匀,测定。结果,所有降解产物与主峰的分度均符合要求,表明该方法的专属性较强,色谱见图1。

### 2.8 样品中肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐及其他有关物质的含量测定

3种已知杂质采用对照品对照法计算含量,有关物质采用主成分自身对照法计算含量。取供试品适量,加水溶解并制成5 000 µg/ml的溶液作为供试品溶液;将供试品溶液稀释成50 µg/ml的溶液作为对照溶液;取肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐对照品适量,加水溶解制成50、50、100 µg/ml的溶液作为对照品混合溶液。进样测定,记录色谱图至主峰保留时间的2倍。结果,供试品溶液和对照品混合溶液色谱见图2,数据结果见表4。

## 3 讨论

### 3.1 波长的选择

采用本文选定的色谱条件,分别对流动相、溶剂、磷酸肌

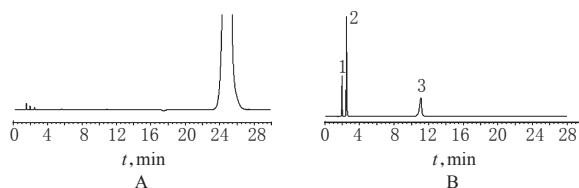


图2 有关物质测定高效液相色谱图

A.供试品溶液; B.对照品混合溶液; 1.肌酸; 2.肌酸酐; 3.磷酸肌酸酐

Fig 2 HPLC chromatograms of related substance tests

A. test sample solution; B. mixed solution control; 1. creatine; 2. creatinine; 3. creatinine phosphate

表4 3批样品中有关物质含量测定结果(%)

Tab 4 Results of content determination of related substance in 3 batches of samples(%)

批号	肌酸	肌酸酐	磷酸肌酸酐	其他有关物质
20111211	0.025	0.022	0.015	0.16
20111221	0.028	0.021	0.011	0.21
20111231	0.029	0.024	0.014	0.19

酸钠对照品、肌酸对照品、肌酸酐对照品、磷酸肌酸酐钠对照品采用PDA检测。结果,肌酸、肌酸酐、磷酸肌酸酐、磷酸肌酸酐钠的最大吸收波长均为210 nm,因此选定210 nm为有关物质检查的检测波长。综合HPLC-PDA检测和专属性试验结果可以看出,磷酸肌酸酐及其杂质在210 nm波长处均可以检出,试验溶液在各种破坏条件下有关物质均能有效检出,主峰与杂质峰之间能够良好地分离。因此,选择210 nm作为有关物质检测波长能有效检出杂质,未漏检杂质峰。

### 3.2 流动相的选择

分别采用0.04、0.05、0.06 mol/L的四丁基磷酸氢铵溶液,并分别调pH为6.8、7.0、7.2,在25、30、35 °C的柱温条件下,对磷酸肌酸酐进行测定。结果发现流动相浓度为0.05 mol/L、pH值为7.0、柱温为30 °C时,磷酸肌酸酐峰的保留时间合适,峰形好,柱效高。同时对不同品牌的色谱柱进行比较,发现Waters C<sub>18</sub>柱较Diamonsil C<sub>18</sub>柱分离效果好、耐用性强。故选作本文的色谱条件进行分析。

### 3.3 溶液稳定性

试验中发现,制备好的溶液在室温放置时,随着放置时间的延长,磷酸肌酸酐峰面积随之减小,有关物质的含量相应增加,对含量和有关物质测定结果影响较大。故建议制备好的溶液于2~8 °C温度条件下保存<sup>[3]</sup>,且宜临用新配。

综上,本文建立的方法灵敏度高、专属性强,可用于注射用磷酸肌酸酐中有关物质的质量控制。

## 参考文献

- [1] 王汝卫.磷酸肌酸的药理与临床应用[J].首都医药,1999,6(5):32.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:172-176.
- [3] 祁广建,沈国英,王毅,等.离子对色谱法测定磷酸肌酸酐的稳定性[J].中国医院药学杂志,2004,24(1):11.

(收稿日期:2012-04-12 修回日期:2012-07-11)