

替曲朵辛原料药含量和有关物质的测定及首批国家标准物质的标定

代秀梅^{1,2*}, 于风平¹, 张启明²(1.淄博市食品药品检验所, 山东 淄博 255086; 2.中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)09-0821-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.09.19

摘要 目的:建立替曲朵辛原料药含量及有关物质的测定方法,并标定首批国家标准物质。方法:采用反相离子对高效液相色谱法。色谱柱为 Agela Venusil ABS-C₈(T),流动相为 10 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液(pH 为 3.0),流速为 0.8 ml/min,检测波长为 195 nm,柱温为 35 ℃。结果:替曲朵辛检测质量浓度线性范围为 0.294~44.16 μg/ml($r=0.999\ 9$),检测限为 48 pg,首批国家标准物质的含量为每瓶 15.12 μg。结论:本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于作为替曲朵辛原料药含量测定和有关物质检查。

关键词 高效液相色谱法;替曲朵辛;含量测定;有关物质;标准物质

Determination of the Content and Related Substance of Tetrodotoxin and First Batch of National Standard Material

DAI Xiu-mei^{1,2}, YU Feng-ping¹, ZHANG Qi-ming²(1.Zibo Institute for Food & Drug Control, Shandong Zibo 255086, China; 2.National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of the content and related substance of tetrodotoxin, and to determine first batch of national standard material. METHODS: Ion-pair RP-HPLC method was adopted. The separation was performed on Agela Venusil ABS-C₈(T) column with mobile phase consisted of 10 mmol/L sodium heptanesulfonate (pH 3.0) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 195 nm and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear range of tetrodotoxin was 0.294-44.16 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with detection limit of 48 pg. The content of national standard material was 15.12 μg. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible. It can be applied for the determination of content and related substance of tetrodotoxin.

KEY WORDS HPLC; Tetrodotoxin; Content determination; Related substance; Standard material

替曲朵辛(Tetrodotoxin, TTX)又名河豚毒素,是一种氨基全氢喹啉化合物,主要存在于河豚鱼卵巢、肝脏等内脏中^[1], 纽虫、蛸蛎、蓝斑章鱼等海洋生物中也含有 TTX^[2], 其为自然界毒性非常强的非蛋白质神经毒素。随着对其毒理、药理作用深入的研究,发现 TTX 还是一种 Na⁺通道抑制剂^[3], 对中枢神经具有较强的抑制作用,具有消炎镇痛^[4]、局部麻醉^[5]、戒毒^[6]等多种功效,对多种钝痛及锐痛均有缓解作用,且不产生依赖性,可减轻晚期癌症患者的疼痛^[7], 因此,其药用价值越来越引起重视^[8]。国内外对 TTX 的研究多局限于河豚鱼等生物中该化合物的定性定量分析^[9-11], 国内也有从药品的角度进行研究的报道,但这些研究中的方法柱效低、保留弱,如高效液相色谱(HPLC)法检测限为 10 ng, 有关物质检查只能分离到 2~3 个杂质,不能满足实际工作的需要^[12-13]。本文采用 C₈ 耐水柱和离子对色谱法建立了 TTX 原料药含量和有关物质的测定方法。该方法柱效高、保留强,检测限为 48 pg, 低于文献^[12-13]方法的 1/200 以下,且 TTX 与相邻杂质的分离更好;有关物质检查中分离到 10 个杂质,可有效控制 TTX 原料药的质量。该方法也被采纳作为替曲朵辛首批国家标准物质的标定方法。

1 材料

AX 26 百万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); LC-10ATVP HPLC 仪,包括 CLASS-VP 工作站(日本岛津公司);毛细管电泳仪,包括二极管阵列检测器(DAD)(美国 Agi-

lent 公司);XFP-10 稀释分配仪(天津天大天发科技有限公司); BF-2000 氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司)。

TTX 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:070304,纯度:99.0%); TTX 原料药(深圳宏锦天生物科技有限公司,批号:070701、070702、070703,纯度:98.6%、98.6%、98.4%);磷酸、庚烷磺酸钠均为分析纯,试验用水为 Millipore 纯化水。

2 含量和有关物质的测定

2.1 色谱条件

色谱柱: Agela Venusil ABS-C₈(T) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节 pH 为 3.0), 流速: 0.8 ml/min; 检测波长: 195 nm; 柱温: 35 ℃; 进样量: 50 μl。

2.2 溶液的制备

对照品溶液:精密称取 TTX 对照品约 1 mg,置于 100 ml 量瓶中,加 0.02% 磷酸溶液适量使之溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液:精密称取 TTX 原料药约 1 mg,置于 100 ml 量瓶中,加 0.02% 磷酸溶液适量使之溶解,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 流动相 pH 值的选择

以 10 mmol/L 庚烷磺酸钠为流动相,用磷酸调节 pH 值,考察 pH 值为 2.5、3.0、4.0、5.0、6.0 时,对 TTX 色谱峰的影响。结果,当 pH 值≥5.0 时主峰的各项参数不佳;随着 pH 值的降低,主峰的保留时间缩短,理论板数增加,主峰与相邻峰分离效果

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0533-3593275。

E-mail: yfpllover@sina.com

良好;其中流动相的最优pH值为3.0。

2.4 专属性考察

2.4.1 空白溶液:以0.02%磷酸溶液为空白溶液。

2.4.2 光照破坏溶液:精密称取TTX原料药1 mg,置于1 ml量瓶中,加0.5 ml的0.02%磷酸溶液使之溶解,置于4 500 lx下光照12 h,用0.02%磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 氧化破坏溶液:精密称取TTX原料药1 mg,置于1 ml量瓶中,加0.3 ml的0.02%磷酸溶液使之溶解,加30%过氧化氢0.5 ml,室温放置4 h,用0.02%磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.4 热破坏溶液:精密称取TTX原料药约1 mg,置于1 ml量瓶中,加0.02%磷酸溶液适量使之溶解,90 ℃水浴中加热破坏3 h,放冷至室温,用0.02%磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

取上述溶液各50 μl注入液相色谱仪,记录色谱图。测试结果显示,空白溶液不干扰测定;破坏试验共得到杂质10个,TTX主峰与各杂质峰分离度良好;各杂质均在TTX主峰保留时间的2倍内出峰,色谱见图1。

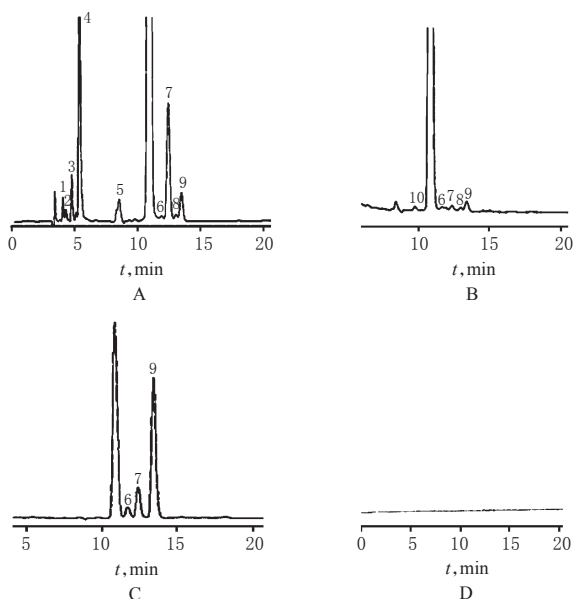


图1 专属性试验高效液相色谱图

A.光照破坏溶液;B.氧化破坏溶液;C.热破坏溶液;D.空白溶液;1~10.杂质

Fig 1 HPLC chromatograms of specification test

A. solution destroyed by light; B. solution destroyed by oxidation; C. solution destroyed by heat; D. blank solution; 1-10. impurity

2.5 线性范围考察

精密称取TTX对照品适量,加0.02%磷酸溶液溶解并稀释成0.368 0 mg/ml的溶液作为贮备液,取贮备液依次稀释成含TTX 44.16、22.08、14.72、7.36、0.460、0.294 μg/ml的溶液,分别进样50 μl,记录色谱图。以浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $y=70\ 000\ 000x-2\ 483.6$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明TTX检测质量浓度线性范围为0.294~44.16 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下对照品溶液,连续进样5次,测定TTX峰面积,计算RSD为0.1%,表明该方法精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取TTX原料药(批号:070701),用0.02%磷酸溶液配成浓度分别为0.12、0.15、0.18 mg/L的溶液各3份,各取50 μl

注入液相色谱仪,记录色谱图。计算其含量的平均值为98.7%,RSD为0.6% ($n=9$),结果表明该方法重复性良好。

2.8 检测限和定量限考察

逐级稀释TTX对照品溶液,进样,记录色谱图。以信噪比为3计,测得检测限为48 pg;以信噪比为10计,测得定量限为120 pg。

2.9 加样回收率试验

分别精密称取TTX对照品约1.0、1.3、1.6 mg各3份,置于100 ml量瓶中,每份中加入TTX原料药(批号:070701)约1 mg,加0.02%磷酸溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。精密量取50 μl注入液相色谱仪,记录色谱图,计算。结果,平均回收率为100.0%,RSD为1.9%,表明该方法的回收率良好,详见表1。

表1 加样回收率测定结果($n=9$)

Tab 1 Results of the recovery test($n=9$)

原料药称样量,mg	对照品称样量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
1.001	0.951	1.937	100.2		
0.998	0.999	1.964	98.4		
0.994	1.098	2.103	102.7		
1.045	1.254	2.282	100.2		
1.014	1.316	2.338	102.1	100.0	1.9
1.021	1.337	2.361	101.8		
0.989	1.644	2.569	97.4		
0.991	1.604	2.561	99.2		
0.995	1.602	2.544	98.1		

2.10 溶液稳定性试验

取“2.2”项下的供试品溶液,室温放置0、2、4、6、8、10、12、24 h,进样50 μl,记录色谱图。结果,TTX峰面积24 h内的RSD为0.59%。表明该供试品溶液在24 h内稳定,可保证检测结果的准确性。

2.11 耐用性考察

固定流动相的浓度为10 mmol/L,改变pH值为2.8、2.9、3.0、3.1、3.2,考察pH值对本色谱系统的影响;固定流动相的pH为3.0,改变流动相浓度为8、10、12 mmol/L,考察流动相浓度对本色谱系统的影响;选用不同色谱柱进行试验。结果在小范围内改动流动相pH值或浓度,主峰保留时间、对称因子、理论板数和相邻杂质的分离度均变化不大;另选用Ultimate、Agilent等品牌的耐水C₈色谱柱试验所得的结果均一致、良好。

2.12 含量测定

取3批原料药按“2.2”项下方法制备成供试品溶液,各进样50 μl,记录色谱图,用外标法计算TTX含量。结果,3批原料药(批号:070701、070702、070703)的含量分别为98.6%、98.6%、98.4%。

2.13 有关物质测定

精密称取TTX原料药约1 mg,置于10 ml量瓶中,加0.02%磷酸溶液适量使之溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液1 ml,置于50 ml量瓶中,加0.02%磷酸溶液适量使之溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。取上述溶液各50 μl注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分保留时间的2.5倍,按照自身对照法计算样品的有关物质。结果,3批原料药(批号:070701、070702、070703)的有关物质总含量分别为1.4%、1.3%、1.7%,单个最大杂质均小于1%。

3 首批国家标准品的标定

3.1 TTX对照品的标定

取经过进一步提纯的TTX原料药,采用上述HPLC法测定其有关物质的含量为0.73%,采用热重分析(TG)法测定其水分含量为0.3%,采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法测定金属元素含量为百万分之七,最终确定TTX对照品的纯度为99.0%。

3.2 分配仪的精密度考察

用水进行分配试验,分配额为0.1 ml,共分配20次。取1支空西林瓶,精密称定,用分配仪分装水,再精密称定其质量,将2次质量相减,就可得到水的精密质量。结果,分配20次水的平均质量为0.100 63 g,RSD为0.37%,表明该仪器精密度良好。

3.3 对照品的分装

精密称取TTX对照品适量,用甲醇-醋酸(pH值为3.5)(70:30)的溶液溶解并稀释成每1 ml含TTX 150 μg 的溶液,用分配仪将其分配为每份100 μl 的溶液至棕色西林瓶中,用氮吹仪将溶液吹干,常温真空减压干燥24 h,充氮,加塞压盖。

3.4 首批国家标准物质的标定

取分装后的TTX对照品20瓶,分别精密加入1 ml的0.02%磷酸溶液,用手腕轻轻晃动使底部的样品充分溶解,再轻轻转动西林瓶,使瓶壁上的样品充分溶解。采用上述HPLC法测定其含量。结果10瓶TTX对照品的平均含量为每瓶15.12 μg ,RSD为0.34%,精密度良好。

3.5 首批对照品的使用方法与用途

取分装后的TTX对照品1瓶,精密加入0.02%磷酸溶液1 ml,用手腕轻轻晃动西林瓶,使底部的TTX充分溶解,再轻轻转动西林瓶,使瓶内的TTX完全溶解,其浓度为15.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$;或者精密加入0.02%磷酸溶液2或3 ml,使其浓度为7.56或5.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。该对照品用于TTX鉴别、检查和HPLC-紫外(UV)定量分析。

4 讨论

TTX在强碱中加热产生物质具有荧光,可用柱后衍生化荧光检测法测定TTX^[9-10];但若杂质的结构与TTX的结构差异大,可能无法进行衍生化反应。经试验发现,样品中含量最大的杂质9在柱后衍生化荧光检测中响应低,几乎检测不到,所以,柱后衍生化荧光检测法不适合作为TTX有关物质的检测方法。由于TTX结构中含有胍基基团,具有末端吸收,本文选用195 nm作为检测波长,大多数杂质都有响应,杂质漏检的可能性小。

通过专属性考察试验,发现TTX对光照、氧化、热均不稳定,有关物质分析中也发现原料药中主要含有杂质6、7、8和9,其中杂质6、7、9为光照和热降解产物,因此,TTX在生产和储藏过程中应该注意避光和低温保存。笔者在专属性考察试验中曾经考察过酸、碱破坏试验,发现TTX及其杂质在强酸、强碱环境下均不稳定,被破坏完全,因此TTX原料药及其制剂必须严格控制酸碱度。

文献^[11]报道使用毛细管电泳法分析TTX,可分离出2个杂质。笔者根据文献报道的条件经过适当的优化后,使用胶束毛细管电泳法来分析TTX原料药的含量和有关物质,结果供试品溶液中只检测出1个杂质峰,而且主峰的响应值较低。原因可能是毛细管电泳法使用的缓冲液的浓度高,其末端吸收强,影响了微量杂质的检出,即使毛细管电泳法能将杂质分开,但是紫外检测器却不能将其检测。因此HPLC法更优于毛

细管电泳法,更适合检测TTX原料药的含量及有关物质。

目前TTX主要从海洋生物内脏中提取,因此TTX非常稀缺、价格昂贵。文献方法中含量和有关物质消耗的TTX原料药和对照品虽然只有几十毫克,但费用却需要几万元,厂家和监督部门在日常工作中很难接受,因此必须提高检测灵敏度,降低TTX的消耗。本文采用精密度为百万分之一的电子天平称量1 mg的样品进行试验,可大大节省样品,对照品标定中采用TG法和ICP-MS法测定水分和金属离子,也是为了降低TTX的消耗。在无国际对照品作为参考的情况下,本文采用HPLC法标定了TTX对照品的纯度。考虑到TTX制剂的规格为5~15 μg ,为减少每次试验的消耗,本文采用了新的对照品分装技术,将TTX对照品分装为常用制剂规格的使用量,既节约成本,又方便使用。

参考文献

- [1] Asakawa M, Toyoshima T, Shida Y, *et al.* Paralytic toxins in a ribbon worm *Cephalothrix* species (Nemertean) adherent to cultured oysters in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan[J]. *Toxicon*, 2000, 38(6):763.
- [2] Yotsu M. Natural homologs of tetrodotoxin. What kind of metabolic differences exist between globefish and salamander? Discovery of 6-epi-11-deoxy derivatives and a key for the elucidation of the biogenesis and metabolism of tetrodotoxin[J]. *Kagaku to Seibutsu*, 1988, 26(10):624.
- [3] 徐英,张永鹤,库宝善.河豚毒素对钠通道的影响及其可能的镇痛机制[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(3):249.
- [4] 张风云,库宝善,姚海燕.河豚毒素单用及与Indoxacarb联合应用的镇痛抗炎作用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(34):115.
- [5] Daniel M, Schwaetz Z. Experimental study of tetrodotoxin: A long-activating topical anesthetic[J]. *Am J Ophthalmol*, 1998, 125(4):481.
- [6] 陈素青,任雷鸣,黄致强.河豚毒素对大鼠和小鼠纳洛酮催促吗啡戒断症状的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001, 15(6):434.
- [7] 徐英,库宝善,胡刚,等.河豚毒素与吗啡联合应用的协同作用研究[J]. *江苏临床医学杂志*, 2001, 5(5):361.
- [8] 代秀梅,庾莉菊,张启明,等.河豚毒素的医药开发前景[J]. *药品评价*, 2008, 5(5):230.
- [9] 崔建洲,申雪艳,宫庆礼.高效液相色谱-紫外/荧光检测方法测定河豚毒素[J]. *色谱*, 2006, 24(3):317.
- [10] Yasumoto T, Michishita T. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography[J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(10):3 077.
- [11] 郭柏坤,宫庆礼,吴韶菊,等.反相离子对高效液相-PDA法测定虫纹东方鲀肝脏中的河豚毒素[J]. *中国海洋药物杂志*, 2006, 25(5):34.
- [12] 陈唯真,朱维华,俞如英.HPLC法测定河豚毒素的含量及稳定性[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(1):41.
- [13] 周芙琼,赵继红,李伟.HPLC法测定河豚毒素原料药的含量及有关物质[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(4):455.
- [14] 张金兰,周同惠.高效毛细管区带电泳测定河豚毒素[J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(4):231.

(收稿日期:2012-08-24 修回日期:2012-10-22)