

HPLC法检查腺苷注射液的有关物质

阚微娜*, 杨宏伟(辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-2000-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.27

摘要 目的:建立腺苷注射液中有物质的检查方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC C₁₈,流动相为乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH 5.8)(12:88),流速为1.0 ml/min,检测波长为260 nm。已知杂质按外标法以峰面积计算含量;总杂质及其他单个杂质以自身对照法计算。结果:在该色谱条件下,腺苷与各杂质分离良好,腺苷检测质量浓度线性范围为0.3~30 μg/ml,特定杂质尿苷、鸟苷、肌苷及腺嘌呤检测质量浓度线性范围均为0.03~3.0 μg/ml($r=0.999\ 8\sim 1.000$),检测限为0.03、0.21、1.20、0.21、0.03 ng。结论:该方法操作简单、灵敏度高,为更好地控制产品的质量提供了有效的检查方法。

关键词 腺苷注射液;高效液相色谱法;有关物质检查;腺嘌呤;尿苷;鸟苷;肌苷

Determination of Related Substances in Adenosine Injection by HPLC

KAN Wei-na, YANG Hong-wei(Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method to determine the related substances in Adenosine injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent TC C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH 5.8, 12:88) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 260 nm. The contents of known impurities were calculated by peak area using external standard; the contents of total impurities and single impurity were calculated by self-control method. RESULTS: The adenosine can be separated from impurities well. The linear relationships of adenosine and impurities (uridine, guanosine, inosine and adenine) were good at the range of 0.3-30 μg/ml and 0.03-3.0 μg/ml ($r=0.999\ 8\sim 1.000$), and the detection limits were 0.03, 0.21, 1.20, 0.21 and 0.03 ng. CONCLUSIONS: The method is simple and sensitive. It can be used to control the quality of the products.

KEYWORDS Adenosine injection; HPLC; Related substance; Adenine; Uridine; Guanosine; Inosine

腺苷(Adenosine)是一种内源性嘌呤核苷。在美国,腺苷是经FDA批准的用于治疗转复阵发性室上性心动过速的一线药物,也是经FDA批准的用于心脏药物负荷试验的两种药物之一^[1],我国批准上市的制剂为注射剂。2010年版《中国药典》未收载腺苷及腺苷注射液,新药注册标准采用高效液相色谱(HPLC)法仅对单个杂质及总杂质进行检查,并未对已知杂质进行控制^[2]。

腺苷的合成可分为生物合成法和化学合成法,在合成过程中易产生其他核苷类的杂质,已确认的核苷类杂质包括鸟苷、尿苷、肌苷和腺嘌呤等^[3-5]。本文参照文献^[6],建立了HPLC法检查腺苷注射液中有物质的方法,并对已知核苷类杂质进行了定量测定,该法操作简单、灵敏度高,能很好地分离腺苷及其他包括核苷类在内的杂质,定量准确、无干扰,为更好地控制产品的质量提供了有效的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A HPLC仪,包括在线真空脱气机、二元泵、自动进

样系统及二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

腺苷对照品(批号:110879-200202,纯度:100%)、腺嘌呤对照品(批号:110886-200001,纯度:99.4%)均来源于中国食品药品检定研究院;尿苷对照品(批号:S46221-328,纯度:≥98%)、鸟苷对照品(批号:027k1610,纯度:≥99.0%)、肌苷对照品(批号:112k7033,纯度:≥99.8%)均来源于美国Sigma公司;腺苷注射液样品(批号:20121224、20121225、20121226,规格:2 ml:6 mg)为辽宁某公司提供;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品贮备液及对照品溶液。取腺嘌呤、尿苷、鸟苷和肌苷对照品约15 mg,精密称定,分别置于50 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为各杂质对照品贮备液;取腺苷对照品约15 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,再精密加入上述各杂质对照品贮备液5 ml,使腺苷溶解,并加水稀释至刻度,作

20.

[2] 初晓,刘爱明,李伟.水合氯醛对大肠杆菌金黄色葡萄球菌抗菌效能的测定[J].中国药师,2003,6(7):415.

[3] 卫生部药政局.中国医院制剂规范:西药制剂[S].2版.北京:中国医药科技出版社,1996:6-7.

[4] 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:附录107-116.

[5] 杜敏.药学微生物实用技术[M].北京:中国医药科技出版社,2009:129.

[6] 张婷,郑绍忠,刘全芳.复方呋喃西林滴鼻液微生物限度检查的验证[J].中国药房,2011,22(45):4 275.

(收稿日期:2013-10-18 修回日期:2013-12-31)

* 主管药师,硕士。研究方向:生化药物分析。电话:024-25425029。E-mail:kanweina@126.com

为混合对照品贮备液。精密量取该贮备液0.5 ml,置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液。取样品溶液5 ml,加水稀释至50 ml,作为有关物质测定用供试品溶液。

2.1.3 自身对照溶液。精密量取供试品溶液1 ml,加水稀释至100 ml,即得。

2.2 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(pH 5.8)(12:88),流速:1.0 ml/min;检测波长:260 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,取混合对照品溶液和供试品溶液(批号:20121224)注入色谱仪,记录色谱图。结果,尿苷、肌苷、鸟苷、腺嘌呤和腺苷峰的保留时间依次为3.49、5.55、5.92、7.01和11.07 min,各色谱峰之间分离度良好,均大于1.5;理论板数以尿苷峰计不低于5 000。色谱图见图1。

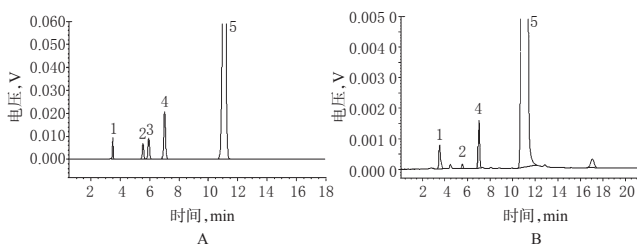


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A.混合对照品溶液;B.供试品溶液;1.尿苷;2.肌苷;3.鸟苷;4.腺嘌呤;5.腺苷

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A. mixed standard references solution; B. test sample solution; 1. uridine; 2. inosine; 3. guanosine; 4. adenine; 5. adenosine

2.3 专属性试验

取批号20121224的样品进行强制降解试验。

2.3.1 酸破坏试验。取样品1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加入2 mol/L HCl溶液0.4 ml,放置1 h,再用2 mol/L NaOH溶液调节至中性,并加水稀释至刻度,依法测定。

2.3.2 碱破坏试验。取样品1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加入5 mol/L NaOH溶液0.4 ml,放置1 h,再用5 mol/L HCl溶液调节至中性,并加水稀释至刻度。

2.3.3 高温破坏试验。取样品1支,置于125 ℃烘箱40 min后取出,冷却至室温后,取1.0 ml加水稀释至10 ml,依法测定。

2.3.4 氧化破坏试验。取样品1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加入30% H₂O₂溶液0.4 ml,放置2 h,加水稀释至刻度,依法测定。

2.3.5 光破坏试验。取样品1支,置于4 500 lx下照射24 h,取1.0 ml加水稀释至10 ml,依法测定。

未破坏样品色谱图见图1B,专属性试验色谱图见图2。

由图2可见,腺苷与各主要杂质及强制破坏产生的降解产物的杂质峰均分离良好。

2.4 线性关系试验

精密量取“2.1.1”项配制的混合对照贮备液0.1、0.5、2.5、5、10 ml,分别置于100 ml量瓶中,加水稀释至刻度,制成线性关系试验系列混合对照品溶液,按“2.2”项色谱条件进行测定。以对照品质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐

标,绘制标准曲线。结果腺苷检测质量浓度线性范围为0.3~30 μg/ml,尿苷、肌苷、鸟苷、腺嘌呤检测质量浓度线性范围均为0.03~3.0 μg/ml,线性方程及相关系数详见表1。

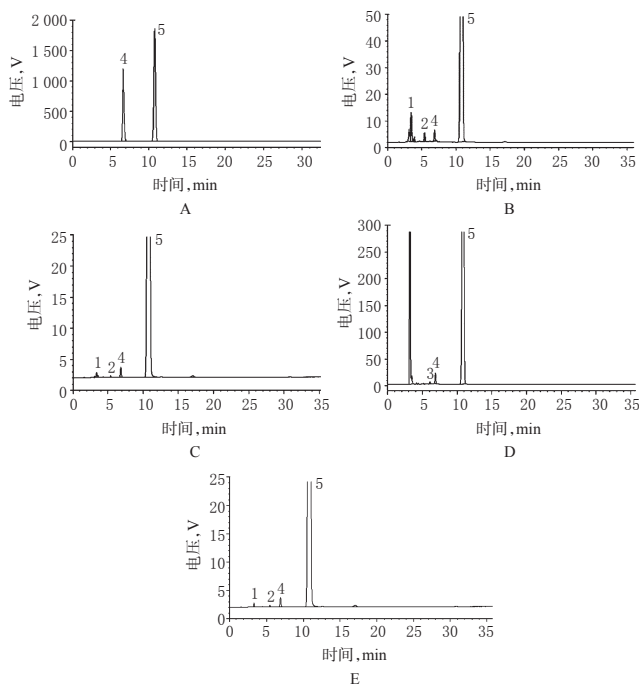


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏后样品;B.碱破坏后样品;C.高温破坏后样品;D.氧化破坏后样品;E.光破坏后样品;1.尿苷;2.肌苷;3.鸟苷;4.腺嘌呤;5.腺苷

Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. sample destroyed by acid; B. sample destroyed by base; C. sample destroyed by heat; D. sample destroyed by oxidation; E. sample destroyed by light; 1. uridine; 2. inosine; 3. guanosine; 4. adenine; 5. adenosine

表1 线性回归分析结果

Tab 1 Linear regression analysis

成分	线性方程	r
腺苷	$y=69\ 904.9x-6\ 117.9$	0.999 9
尿苷	$y=1\ 123.9x-399$	0.999 8
鸟苷	$y=2\ 258.4x-592$	0.999 9
肌苷	$y=1\ 626.5x-309$	1.000 0
腺嘌呤	$y=120\ 868.0x-758.3$	0.999 9

2.5 精密度试验

取线性关系试验第3点的混合对照品溶液,按照“2.2”项色谱条件连续进样5次,测定腺苷、尿苷、肌苷、鸟苷、腺嘌呤的峰面积,计算RSD分别为0.04%、0.36%、0.31%、0.59%和0.10%(n=5),表明精密度良好。

2.6 重复性试验

取批号20121224的样品按“2.1.2”项下方法配制6份供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定峰面积,并计算样品中核苷类杂质以及总杂质的量,结果表明方法重复性良好,详见表2。

2.7 加样回收率试验

根据重复性试验结果,样品(批号:20121224)中含腺嘌呤、尿苷和肌苷3种已知杂质,含量分别为1.089、0.039、0.330 μg/ml。精密量取该样品2.5 ml,置于50 ml量瓶中,再加入

“2.1.1”混合对照品溶液 2.5 ml,加水稀释至刻度,共配制 6 份,依法测定、计算,结果表明方法加样回收率结果良好,详见表 3。

表 2 重复性试验结果

Tab 2 Results of repeatability test

次数	含量, $\mu\text{g/ml}$				总杂质, %
	尿苷	鸟苷	肌苷	腺嘌呤	
1	0.332	-	0.038	1.089	0.14
2	0.328	-	0.039	1.084	0.14
3	0.339	-	0.039	1.091	0.14
4	0.320	-	0.041	1.093	0.14
5	0.329	-	0.038	1.081	0.14
6	0.331	-	0.040	1.096	0.14
RSD($n=6$), %	1.88	-	2.99	0.52	0

注:“-”表示未检出

note:“-” means not detected

表 3 回收率试验结果(%, $n=6$)

Tab 3 Results of recovery test(%, $n=6$)

指标	尿苷	鸟苷	肌苷	腺嘌呤
回收率	101.56	100.91	103.41	101.77
	101.39	100.76	102.41	102.79
	100.79	100.07	102.07	102.71
	100.99	100.07	101.75	102.78
	101.42	100.09	102.79	102.84
	100.31	100.11	100.77	102.57
平均回收率	101.1	100.3	102.2	102.6
RSD	0.47	0.39	0.89	0.40

2.8 溶液稳定性试验

取线性关系试验第 3 点的混合对照品溶液,室温放置 0、2、4、6、8 h 进样,以腺苷、尿苷、鸟苷、肌苷及腺嘌呤的峰面积计,RSD 分别为 0.10%、0.23%、0.65%、0.37% 和 0.19% ($n=5$),表明溶液在 8 h 内稳定。

2.9 检测灵敏度试验

将线性关系试验第 1 点的混合对照品溶液进行一系列稀释,照“2.2”项色谱条件分别测定,计算信噪比,以信噪比为 3:1 和约 10:1 分别确定检测限和定量限。结果腺苷、尿苷、鸟苷、肌苷及腺嘌呤的定量限依次为 0.15、0.60、2.40、0.60、0.12 ng,检测限依次为 0.03、0.21、1.20、0.21、0.03 ng。

2.10 色谱柱耐用性考察

取批号为 20121224 的样品,分别采用不同品牌的色谱柱,考察方法的耐用性。色谱柱 1 为 Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),色谱柱 2 为 Diamonsil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果表明方法色谱柱耐用性较好,详见表 4。

表 4 色谱柱耐用性试验结果(%)

Tab 4 Results of chromatographic durability test(%)

色谱柱	尿苷	鸟苷	肌苷	腺嘌呤	其他单个最大杂质	总杂质
1	0.01	-	0.001	0.04	0.03	0.14
2	0.01	-	0.001	0.04	0.03	0.14

注:“-”表示未检出

note:“-” means not detected

2.11 样品中有关物质的检查

取 3 批样品,按“2.1”项下方法制备溶液,照“2.2”项下色谱条件进样试验。已知杂质按外标法以峰面积计算含量;总杂质及其他单个杂质以自身对照法计算。测定结果见表 5。

表 5 3 批样品中有关物质检查结果(%)

Tab 5 Determination of related substances of 3 batches of sample(%)

批号	尿苷	鸟苷	肌苷	腺嘌呤	其他单个最大杂质	总杂质
20121224	0.01	-	0.001	0.04	0.03	0.14
20121225	0.01	-	0.001	0.07	0.03	0.16
20121226	0.01	-	0.001	0.04	0.01	0.14

注:“-”表示未检出

note:“-” means not detected

3 讨论

3.1 测定波长的选择

本研究采用二极管阵列检测器(DAD)对混合对照品溶液进行了全波段波长扫描,对专属性测定溶液及供试品溶液的色谱峰及已知杂质峰进行了峰纯度测定,包括腺苷在内的 5 种核苷酸类物质的最大吸收波长均在 250~260 nm 之间。本文选择了 260 nm 作为有关物质的检测波长。综合 HPLC-DAD 的检测和专属性试验结果,测定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分离。

3.2 色谱条件的比较

《美国药典》35 版及《英国药典》2012 年版腺苷有关物质项下的 HPLC 法亦可同时测定本文涉及的 4 个已知杂质,但其流动相中加入了离子对试剂四正丁基磷酸铵^[4-5],受不同品质离子对试剂的影响,方法重现性较差。与《美国药典》方法相比,本方法的流动相配制简单,对色谱柱的损伤远远小于离子对色谱法,易于操作,色谱峰形好,更适用于企业质量控制。

根据样品测定结果,腺嘌呤是腺苷注射液中存在的主要已知杂质,而尿苷和肌苷的含量相对较少,鸟苷未检出。由专属性试验结果了解到,腺苷注射液在酸破坏条件下,可产生大量腺嘌呤,在其他条件下相对稳定,因此企业在生产过程中应注意控制样品的 pH,以减少腺嘌呤的产生。

腺苷注射液作为心脏用药及婴幼儿用药^[6],更加严格的杂质控制可以更好地保证患者的用药安全。

参考文献

- [1] 施庆杉,林小平,许虹,等.腺苷的微生物合成研究[J].发酵科技通讯,2005,34(2):119.
- [2] 国家食品药品监督管理局.WS-928(X-687)-2006 腺苷注射液(供诊断用)标准[S].2006-09-14.
- [3] 袁亚峰,孙莉,裴文,等.腺苷合成研究进展[J].合成化学,2011,11(4):307.
- [4] 美国药典委员会.美国药典[S].35 版.华盛顿:美国药典委员会,2012:2 079-2 080.
- [5] 英国药典委员会.英国药典[S].2012 年版.伦敦:英国药典委员会,2012:71-72.
- [6] 张文萌,贾玉荣,付锦楠,等.RP-HPLC 法同时测定熟地黄中 5 个核苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(1):94.
- [7] 邢家林,李蛟,李蔚然,等.腺苷在婴幼儿体外循环心脏术中心肌保护作用的研究[J].中国体外循环杂志,2012,10(4):200.

(收稿日期:2013-11-01 修回日期:2013-12-18)