

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.017

注射用三磷酸胞苷二钠含量均匀度测定方法研究*

张雪艳, 周长明, 赵璇[△]

(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 建立测定注射用三磷酸胞苷二钠含量均匀度的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈(90:10, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 271 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。以胞苷为对照品, 折算系数为 2.167, 按外标法计算注射用三磷酸胞苷二钠的含量均匀度, 以 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0941 要求的 $A + 2.2S \leq 15.0$ 为判定标准考察整体情况。结果 三磷酸胞苷二钠质量浓度在 0.019 11~1.910 95 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 精密度的 $RSD < 0.05\%$ ($n = 6$), 平均加样回收率为 99.89%, RSD 为 1.30% ($n = 9$)。7 个厂家 29 批样品中有 5 个厂家共 10 批次样品含量均匀度不符合规定。结论 现行药品质量标准中含量均匀度测定项存在一定问题, 以胞苷为对照的 HPLC 法测定注射用三磷酸胞苷二钠含量均匀度方法更科学、更准确, 能更好地控制产品质量。

关键词: 注射用三磷酸胞苷二钠; 胞苷; 含量均匀度; 外标法; 高效液相色谱法

中图分类号: R927; R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)08-0072-04

Study on Determination Method of the Uniformity of Dosage Unit of Cytidine Disodium Triphosphate for Injection

ZHANG Xueyan, ZHOU Changming, ZHAO Xuan

(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, China 102206)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the determination of the uniformity of dosage unit in Cytidine Disodium Triphosphate for Injection. **Methods** The chromatographic column was Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L Phosphate buffer-acetonitrile (90:10, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 271 nm, the column temperature was 35 °C, the injection volume was 20 μL. Cytidine was used as a reference to calculate the uniformity of dosage unit in Cytidine Disodium Triphosphate for Injection according to the external standard method, and the convert coefficient was 2.167. All the situation of the uniformity of dosage unit was investigated by the judgment criteria of $A + 2.2S \leq 15.0$ from General Rule 0941 of the Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition, Volume IV). **Results** The mass concentration of cytidine disodium triphosphate showed a good relationship with the peak area in the range of 0.019 11-1.910 95 mg/mL. The RSD of precision test was less than 0.05% ($n = 6$), the average recovery was 99.89% with RSD of 1.30% ($n = 9$). The uniformity of dosage unit of ten batches samples from five manufacturers were out of regulations among 29 batches of samples from seven manufacturers. **Conclusion** There are some problems for the determination items of the uniformity of dosage unit in the current drug quality standard. Cytidine is used as a reference in the HPLC method for the determination of the uniformity of dosage unit of Cytidine Disodium Triphosphate for Injection, which is more scientific and accurate, and can be used for the quality control of the injection.

Key words: Cytidine Disodium Triphosphate for Injection; cytidine; uniformity of dosage unit; external standard method; HPLC

三磷酸胞苷二钠(CTP)属核苷酸衍生物, 主要参与核酸及磷脂的代谢, 促进蛋白质合成。CTP可在人体内转化成二磷酸胞苷(CDP)和一磷酸胞苷(CMP), 并释放能量, 是脑磷脂合成与核酸代谢的中间产物和能量来源, 可通过血-脑屏障, 提高神经细胞抗损伤能力, 对脑组织有营养、促进再生、修复的作用^[1-2]。考察7厂家29批注射用三磷酸胞苷二钠的含量均匀度时, 发现各

家企业标准中该检查项差异较大, 2家未设定该检查项, 5家采用紫外-可见分光光度法, 在280 nm波长处测定单支样品溶液吸光度值, 并与10支样品溶液吸光度的平均值比较。按原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: 第16册》及多版CTP注射液标准(YBH20032004, YBH24642005, YBH36782005, YBH39322005, YBH07902006, YBH18242006)对注射

*基金项目: 2016年国家药品抽检项目。

第一作者: 张雪艳, 女, 硕士, 药师, 研究方向为生化药物及生物制品质量控制, (电子信箱)BJzhangxueyan@126.com。

[△]通信作者: 赵璇, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为生化药物及生物制品质量控制, (电子信箱)xuanzhao117@163.com。

用三磷酸胞苷二钠的含量均匀度进行测定,7厂家29批样品均低于 $\pm 15\%$ 限度值,全部合格。由于CTP降解生成CDP和CMP,有效基团并未发生改变,降解产物依然具有紫外吸收,故紫外-可见分光光度法测定制剂时专属性差,且结果判定范围过于宽泛,并不能有效控制制剂质量。本研究中建立了以胞苷为对照品的高效液相色谱(HPLC)法测定含量均匀度,并参考2020年版《中国药典(四部)》通则0941要求,以 $A + 2.2S \leq 15.0$ 为判定标准^[3],考察市售注射用三磷酸胞苷二钠含量均匀度的整体情况。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UV-2450型紫外分光光度计,LC-20AT型高效液相色谱仪(包括SPD-M20A型二极管阵列检测器、Shimadzu LC-Solution色谱工作站),均购自日本Shimadzu公司。

1.2 试药

注射用三磷酸胞苷二钠(国家评价性抽验样品,来自7个厂家,共29批);CTP对照品(中国食品药品检定研究院,批号为140758-201101,含量92.90%);胞苷对照品(美国Sigma公司,批号为BCBV5023,含量99.9%);四丁基溴化铵为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.02 mol/L磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钠3.58 g,磷酸二氢钾1.36 g,加水900 mL使溶解,调pH至7.0,加入四丁基溴化铵1 g,加水定容至1 000 mL)-乙腈(90:10, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:271 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

称取CTP对照品20 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,得质量浓度为0.4 mg/mL的CTP对照品溶液。称取胞苷对照品20 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,摇匀,即得质

量浓度为0.2 mg/mL的胞苷对照品溶液。取样品适量,每支用流动相溶解并转移至50 mL(规格为20 mg)或100 mL(规格为40 mg)容量瓶中,用流动相定容,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下CTP对照溶液适量(水浴1 h),以及胞苷对照品溶液和供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。理论板数按CTP峰计应不低于3 000,分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1。

线性关系考察:取CTP对照品适量,精密称定,用流动相制成系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以CTP质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 17\,256\,815X + 94\,796$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,CTP质量浓度在0.019 11~1.910 95 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

进样精密度试验:取2.2项下供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为0.05% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

加样回收试验:取已知含量(92.60%)的样品适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的CTP对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 以胞苷为对照品计算校正因子

标准曲线斜率比值:称取胞苷对照品4.86, 9.18, 13.17, 19.30, 24.65 mg,精密称定,分别置100 mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,作为胞苷对照品系列溶液。取CTP对照品5.63, 12.00, 14.37, 19.96, 25.80 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,作为CTP对照品系列溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得胞苷和CTP回归方程分别为 $Y_1 = 33\,519\,577X_1 + 548\,544$ ($r > 0.998$)

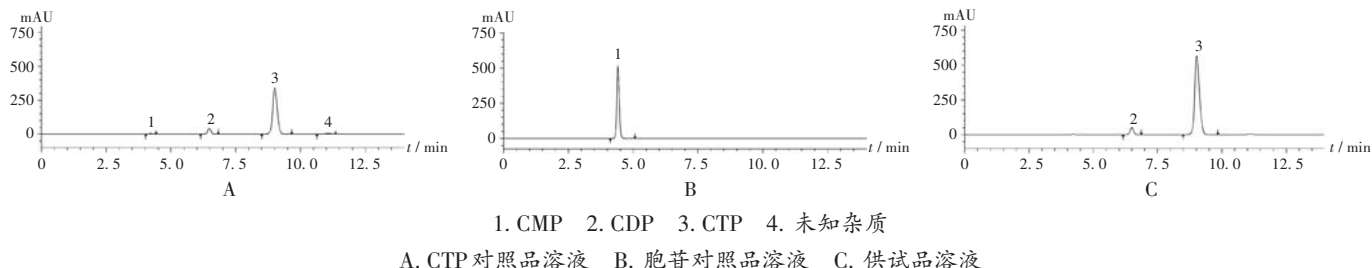


图1 高效液相色谱图

1. CMP 2. CDP 3. CTP 4. Unknown impurity
A. Reference solution of CTP B. Reference solution of cytidine C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Results of the recovery test($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
10.83	7.07	16.56	99.40		
11.37	7.98	18.06	101.63		
10.94	7.02	16.65	100.00		
10.83	10.04	19.40	100.48		
10.87	11.99	21.14	99.46	99.89	1.30
11.93	11.01	21.37	100.95		
10.42	13.55	21.94	97.64		
10.40	13.84	22.28	98.41		
10.97	14.48	23.74	101.00		

和 $Y_2 = 15\,452\,159X_2 + 45\,500$ ($r > 0.998$)。质量浓度相同时,胞苷与CTP的峰面积之比($K_{\text{胞}}/K_{\text{CTP}}$)为2.169。

胞苷吸收系数测定:取胞苷对照品溶液与相同浓度CTP对照品溶液,以流动相为稀释剂,于200~400 nm波长范围内扫描紫外光谱图,狭缝宽度为1.0 nm,得到胞苷和CTP最大吸收波长均为271 nm。取胞苷对照品溶液与CTP对照品溶液,分别以紫外分光光度计测定271 nm波长处吸光度值,并用最大值计算吸收系数(E)。结果胞苷吸收系数为375.7,CTP吸收系数为172.4,两者吸收系数比值为2.179。

2.5 样品含量均匀度测定

取29批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,以胞苷为对照品的外标法,采用2.167为折算系数计算样品含量均匀度。并与法定检验方法^[3]结果比较。结果见表2。

3 讨论

根据批准文号信息,多数生产厂家采用纸电泳法测定含量,含量均匀度采用紫外分光光度法在280 nm波长处测定吸光度值,计算10支样品吸光度值的偏差。紫外分光光度法测定的吸光度值不能反映CTP主成分降解情况,即不能准确测定药物制剂的含量均匀度。根据本课题组前期已优化好的色谱条件及文献^[4-5],本研究中采用了2种确定校正因子的测定方法:质量浓度相同时胞苷与CTP的峰面积之比为2.169;紫外吸收系数之比为2.179,这两种方法与CTP的质量比的经典公式中的2.167($\text{CTP相对分子质量}/\text{胞苷相对分子质量} = 527.1/243.2 = 2.167$)标准差 $\leq 0.5\%$ 。考虑到HPLC法及紫外分光光度法测定结果存在一定误差,计算过程中折算系数采用质量比公式中的2.167。本研究中建立了以胞苷为对照品,以2.167为折算系数的外标法,考察了国家评价性抽验中注射用三磷酸胞苷二钠的含量均匀度。

表2 各生产厂家样品含量均匀度测定结果

Tab.2 Determination results of uniformity of dosage unit of samples from different manufacturers

生产厂家	批号	A值	2.2S值	A+2.2S值	与法定检验结果的最大偏差(%)
A	1605181-2	4.46	2.25	6.7	6.5
	1605181-1	1.06	2.44	3.5	3.5
	1601181-1	2.31	1.90	4.2	6.6
	1603221-3	5.83	10.50	16.3	4.0
B	20160501	0.62	7.14	7.8	1.7
	20160502	1.92	6.85	8.8	4.7
	20160301	1.56	0.91	3.4	3.6
C	1509130912	28.02	2.30	30.3	
	160528101	20.96	3.81	24.8	
D	201602012	18.26	5.84	24.1	6.8
	201501011	40.51	8.69	49.2	4.8
	201509021	9.24	1.10	10.3	4.6
	201512012	15.90	3.15	19.1	5.1
	201503011	19.96	2.69	22.7	4.9
E	15100625	14.67	2.72	17.4	1.1
F	516022033	10.25	7.58	17.8	
	515112122	14.31	2.51	16.8	
G	1511285	3.82	4.07	7.9	4.5
	1503035	1.26	1.12	2.4	4.8
	1509235	3.28	7.02	10.3	5.7
	1505105	4.14	1.49	5.6	2.9
	1603015	4.87	3.05	7.9	2.0
	1602265	3.40	4.15	7.5	3.6
	1510245	3.00	6.17	9.2	3.2
	1601085	4.17	2.34	6.5	2.2
	1509195	2.90	1.00	3.9	1.7
	1602285	4.82	1.38	6.2	2.5
	1507125	3.17	1.11	4.3	1.3
	1510225	3.23	1.10	4.3	4.7

注射用三磷酸胞苷二钠由于热不稳定等原因,结合市场药品实际情况,目前现行标准未对含量测定设置上限,企业存在多投料,以规避产品降解后含量测定不合格的风险。按照2020年版《中国药典(四部)》判定含量均匀度结果, $A+2.2S$,其中A值可以对目前市场上高投料的情况进行控制,2.2S值可对同一批样品中每瓶的均质程度进行控制。装量差异或紫外分光光度法均无法对主成分的均匀性进行考察,均为间接测定产品符合标示量程度的指标。

另有企业采用HPLC法根据经典公式计算CTP的质量比(%),再结合紫外分光光度法测定总核苷酸,最终通过计算得到含量^[6]。该方法采用HPLC和紫外两步