

三磷酸腺苷二钠氯化钠注射液质量研究

赵 岚 盛炳义¹ (杭州 310012 浙江省医药发展有限公司,¹ 杭州 310003 浙江大学医学院附属儿童医院)

摘要 目的:建立三磷酸腺苷二钠(ATP)氯化钠注射液中 ATP 的含量及有关物质测定方法。方法:采用高效液相色谱法,固定相为岛津 WAX-1 柱,以磷酸氢二钠缓冲液为流动相,检测波长为 259nm,测定该制剂中 ATP 及有关物质的含量。结果:ATP 的平均回收率为 100.4%,RSD%为 0.32%。结论:本法操作简便,结果准确,可以作为 ATP 氯化钠注射液的质量控制指标。

关键词 三磷酸腺苷二钠;高效液相色谱法

A study on the Quality of Adenosine Disodium Triphosphate and Sodium Chloride Injection

hao Lan (Zhao L) , ¹ Sheng Bing Yi (Sheng BY) (Zhejiang Medicine Information Station , Hangzhou 310012 , ¹ Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine , Hangzhou 310003)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of adenosine disodium triphosphate in adenosine disodium triphosphate and sodium chloride injection. **METHOD:** HPLC was selected to determine the content, column: WAX-1 (Shimadzu) , detector: uv $\lambda = 259\text{nm}$, mobile phase: 0.25 mol/L phosphate buffer solution (adjust pH to 7.0). **RESULTS:** The regression equation was $y = 9188755 C - 7143.4$, $r = 0.9999$ (10 ~ 100 mg/ml). The average recovery was 100.43 % , (RSD % = 0.32 %). **CONCLUSION:** It is a suitable method for the determination of ATP in ATP and NaCl injection.

KEY WORDS ATP, HPLC

三磷酸腺苷二钠(ATP)是一种辅酶,为生物体能量储存和释放的中心物质,机体中的物质代谢所产生的能量和各种生理生化功能活动所需要的能量,均需通过它来进行转换。ATP 适用于因细胞损伤后细胞酶减退引起的疾病。临床上主要用于心力衰竭、心肌炎等疾患。目前所用的 ATP 均为粉针和小针,使用时将其溶解后注入输液中静脉滴注。随着输液工业的发展和临床治疗的需要,近年来国内外将治疗作用确切,必须从静脉途径给药的稳定药物或药物小针或粉针剂制成输液剂,同时也是为了减少二次污染的机会。据此我们研制开发了化学药品四类新药三磷酸腺苷二钠氯化钠注射液(大容量)。本文采用高效液相色谱法测定其中的 ATP 的含量及检测 ATP 的分(降)解产物。

1 ATP 的含量测定

1.1 仪器与材料

仪器:日本岛津公司 高效液相色谱仪 LC-10ATVP; SPD-10A 紫外检测器。

对照品:三磷酸腺苷二钠(ATP) (SIGMA 公司)

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适用性

岛津 WAX-1 柱($4.5 \times 10\text{cm}$),用弱碱性离子交换球状硅胶为填充剂;以磷酸氢二钠缓冲液(用 0.25 mol/L 的磷酸二氢钾溶液调节 0.25 mol/L 的磷酸氢二钠溶液的 pH 值至 7.0)为流动相;调节流动相的流速使 ATP 的出峰时间约为 10 分钟;检测波长为 259nm。ATP 与相邻峰的分度应大于 3.0。

1.2.2 标准曲线的制备

精密称取 ATP 对照品约 20 mg,加水定量稀释成每 1 ml 约含 1 mg 的溶液。摇匀,照样品测定项下的方法,分别精密量取 2.4.6.8.10.20 μl ,注入液相色谱仪,记录色谱图,经线性回归后得: $y = 9188755 C - 7143.4$ $r = 0.9999$ 。ATP 在 10 ~ 100 mg/ml 的浓度范围内呈良好线性关系。

1.2.3 专属性试验

取处方量辅料,按上述方法操作,结果表明辅料对检测无干扰。

1.2.4 回收率试验

精密称取 ATP 对照品适量,加入按处方量配制的空白

溶液,溶解并定量稀释制成每 1 ml 中约含 0.32, 0.40, 0.50 mg 的溶液,精密量取 20 μl ,注入液相色谱仪,记录色谱图;另取 ATP 对照品,同法测定,计算每份的回收率。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

投入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD %
3.25	3.28	100.92		
3.25	3.25	100.00		
3.25	3.27	100.62		
4.06	4.08	100.49		
4.06	4.07	100.25	100.43	0.32
4.06	4.06	100.00		
5.08	5.12	100.79		
5.08	5.10	100.39		
5.08	5.10	100.39		

1.2.5 样品测定

取减压干燥至恒重的 ATP 对照品适量,精密称定,用流动相制成每 1 ml 含 0.4 mg 的对照品溶液;精密量取本品和对照品溶液各 20 μl ,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,即得。三批样品测定结果如表 2 所示。

表 2 ATP 氯化钠注射液中 ATP 的含量测定结果

批 号	标示含量(%)
010604	101.3
010605	101.1
010606	100.7

1.2.6 精密度试验

取本品一批(批号:010604),于同一日内及不同日内分别按上述方法测定含量 5 次,得到日内和日间的精密度为:

日内:ATP 的平均含量为 101.6 %, RSD % 为 0.32 %;

日间:ATP 的平均含量为 101.7 %, RSD % 为 0.40 %。

1.2.7 溶液的稳定性及进样重现性

取含量测定项下供试液,分别在 0.4.6.8.12 小时进样,测得峰面积的 RSD % 为 0.44 %。结果表明本品 12h 内稳定,进样重现性良好。

2 有关物质的检测

ATP 氯化钠注射液中的分(降)解产物主要是 ADP 和 AMP,因此可以采用与 ATP 含量测定相同的方法来检测其中的有关物质。

2.1 仪器与材料
同前

2.2 方法与结果

2.2.1 色谱条件与系统适用性

岛津 WAX-1 柱(4.5×10cm),用弱碱性离子交换球状硅胶为填充剂;以磷酸氢二钠缓冲液(用 0.25 mol/L 的磷酸二氢钾溶液调节 0.25 mol/L 的磷酸氢二钠溶液的 pH 值至 7.0)为流动相;调节流动相的流速使 ATP 的出峰时间约为 10 分钟;检测波长为 259nm。ATP 与相邻峰的分离度应大于 3.0。量取本品 20μl,注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍,按峰面积归一化法计算,即得。

2.2.2 方法的专属性

取本品溶液适量(约相当于 ATP 4mg),分别置三个具塞试管中,加入 10%的氢氧化钠溶液、10%的磷酸溶液和 30%的过氧化氢溶液各一滴,置 40℃水浴中加热 0.5 小时,放冷后,中和,分别取 20μl 进样;另取经 4500LX 光照射 10 天的样品和 115℃加热 1 小时的样品,同法测定。结果表明,本品经酸、碱、氧化及热破坏后,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 ATP 的分(降)解产物,本品对光稳定。

2.2.3 检测波长的选择

本品经酸、碱、氧化及热降解后,所产生的杂质在 259nm 的波长处均能被检出,故选择此波长。

2.2.4 辅料的干扰

取辅料,按处方配成空白溶液,同法操作,结果未见出峰,说明辅料无干扰。

2.2.5 保留时间的确定

当记录至 ATP 保留时间的 3 倍时,ATP 后有一杂质峰,但其酸、碱、氧化及热降解产物均在主峰前或主峰保留时间 2 倍内出峰,故检查中选定记录至 ATP 峰保留时间的 2 倍。

2.2.6 检测限

本品的最低检测浓度为 0.2μg/ml,最低检测量为 4ng。

2.2.7 有关物质的测定

取本品作为供试品溶液,量取 20μl,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍,按面积归一化计算。三批样品测定结果见表 3。

表 3 ATP 氯化钠注射液中有 关物质测定结果

批 号	有关物质(%)
010604	3.69
010605	3.71
010606	3.70

3 讨论

3.1 目前临床上使用的 ATP 注射液(小针)的含量测定方法是 用紫外分光光度法,但 UV 法测出的是 ATP、ADP 和 AMP 的总量;尽管 ADP 和 AMP 也是能量补剂,但用该方法作为 ATP 氯化钠注射液(大容量)的质控方法,显然是不妥的,参照《日本局外方》(1997 年)中 ATP 注射液的含量测定方法,选择离子交换色谱柱,能将三者完全分离,这样就可以很确切地控制 ATP 的含量。

3.2 ATP 经酸、碱、氧化和热分解后的样品,在该色谱条件下能很容易地检测出各自的分(降)解产物,说明该方法的专属性、灵敏度均较高。

参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部.生化药品第一分册.1998 三磷酸腺苷二钠及注射液质量标准.
- 2 中国药典.2000 年版 2 部.
- 3 国家药典委员会.国家药品标准工作手册.
- 4 袁伯俊.新药评价基础与实践.1998,12.
- 5 日本局外方.1997.