

离子色谱-抑制电导检测法测定环磷酰胺相关物质 A 的含量

袁红露^{1,2}, 朱程玉^{1,2*}, 李伟举², 杨荷友², 黄梅¹, 周雪飞² (1. 浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州 310058; 2. 浙江正药业股份有限公司, 浙江 台州 318001)

摘要: 目的 采用离子色谱-抑制电导检测法测定环磷酰胺相关物质 A 的含量。方法 采用色谱柱 IonPac CS12A (250 mm×4.0 mm Analytical), 以 0.16% 甲烷磺酸为流动相, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测器为电导检测器, 柱温为 25 °C, 进样量为 25 μL。结果 环磷酰胺相关物质 A 的定量下限为 1.8 μg·mL⁻¹, 检测限为 0.54 μg·mL⁻¹; 在 1.8~24 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r>0.999$), 在不同浓度水平范围内的平均回收率为 97.45%~99.81%, RSD<3%。结论 本方法选择性好, 灵敏度高, 结果可靠, 可满足环磷酰胺相关物质 A 检验分析的需要。

关键词: 离子色谱法; 抑制电导检测法; 环磷酰胺; 相关物质 A

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)05-0567-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.013

Determination of Cyclophosphamide Related Substance A by Ion Chromatography-Suppressed Conductivity Detection

YUAN Honglu^{1,2}, ZHU Chengyu^{1,2*}, LI Weiju², YANG Heyou², HUANG Mei¹, ZHOU Xuefei² (1. Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish ion exchange chromatography-suppressed conductivity detection for the determination of related substance A in cyclophosphamide. **METHODS** Using a Ionpac CS12A column (250 mm×4.0 mm Analytical), the mobile phase was 0.16% methane sulfonic acid, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with suppressed conductivity detector; the column temperature was 25 °C; and the inject volume was 25 μL. **RESULTS** The detection and quantification limit was 0.54 and 1.8 μg·mL⁻¹, respectively. The linear range for the content of degradation impurity A was 1.8~24 μg·mL⁻¹ ($r>0.999$), the average recoveries were in the range of 97.45%~99.81% with the relative standard deviation below 3%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and is suitable for the determination of cyclophosphamide degradation impurity A.

KEY WORDS: ion chromatography; suppressed conductivity detection; cyclophosphamide; related substance A

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是临床常用的烷化剂类免疫抑制剂。CTX 主要用于肿瘤免疫, 对多种肿瘤有明显的抑制作用, 1958 年首次人工合成, 近年来因证实它有免疫抑制作用而用于多种自身免疫性疾病的治疗, 已取得明显疗效^[1-2]。CTX 在体外无抗肿瘤活性, 进入体内后先在肝脏中经微粒体功能氧化酶转化成醛磷酰胺, 而醛磷酰胺不稳定, 在肿瘤细胞内分解成酰胺氮芥及丙烯醛, 酰胺氮芥对肿瘤细胞有细胞毒作用。CTX 适用于恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、淋巴细胞白血病、实体瘤如神经母细胞瘤、卵巢癌、乳癌、各种肉瘤及肺癌等^[3-6]。同其他细胞毒类药物一样, 不良反应仍是环磷酰胺在临床应用不容忽视的问题^[7-8]。

控制产品中高分子杂质的含量是减少此类细胞毒类药物不良反应的根本途径。在环磷酰胺制造中, 原料的制备、产品的合成和保存等过程中均会不同程度地带入一些杂质^[9]。杂质和副产物可能对人体有潜在的毒性, 因此准确地鉴定微量杂质和副产物极其重要^[10-11]。目前 USP 药典收录的环磷酰胺杂质为 4 种降解产物即相关物质 A~D, 其中相关物质 A [二(2-氯乙基)胺盐酸盐]具有高毒性, 腹腔注射大鼠的 LD₅₀ 为 100 mg·kg⁻¹; 皮下注射小鼠的 LD₅₀ 为 20 mg·kg⁻¹, 对人亦有致突变作用。USP 收录的相关物质 A 检测方法为薄层色谱法^[12], 其检测灵敏度较高, 但仅为定性分析, 随着对药物质量及杂质控制的要求越来越严格, 迫切需要建立更精确快速的杂质的定量检测分析方

作者简介: 袁红露, 女, 硕士, 工程师 Tel: 13736684572
13736684571 E-mail: ericpharmacy@gmail.com

E-mail: mailxz@163.com

*通信作者: 朱程玉, 男, 助理工程师

Tel:

法。离子色谱法是在离子交换色谱法的基础上建立起来的一种离子分离分析液相色谱技术,具有操作简便、灵敏快速、精密度高、抗干扰能力强、分析结果准确可靠等优点^[13-14]。离子色谱与最常用的离子色谱检测方式-抑制电导检测器联用,在药物及合成中间体的分析、复杂组分中的某一组分鉴定、药物离子的价态及形态分析等方面有广泛的应用^[15-18]。本实验采用阳离子交换色谱法-抑制电导检测法测定环磷酰胺相关物质 A 的含量,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与试剂

ICS3000 离子色谱仪(美国 Dionex); 色谱柱 lonPac CS12A 250 mm×4.0mm Analytical (046073); XP205 电子分析天平(瑞士 Mettler)。环磷酰胺对照品(USP 药典委员会,批号: JIB 200, 纯度: 100%); 环磷酰胺相关物质 A 对照品(美国 Sigma, 批号: 08315KD-389, 含量 98%); 环磷酰胺原料药样品(浙江海正药业股份有限公司, 批号: 120301~12306); 美国 Milli-Q 纯化水。

1.2 标准溶液的制备

环磷酰胺对照品储备液: 称取环磷酰胺对照品 12.0 mg, 加超纯水溶解并稀释定容至 10 mL, 作为环磷酰胺对照品储备液, 终浓度为 $1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

相关物质 A 对照品储备液: 称取环磷酰胺相关物质 A 对照品 120.0 mg 溶解于超纯水中, 定容至 100 mL, 作为环磷酰胺相关物质 A 的对照品储备液, 浓度为 $1.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 将该对照品储备液稀释至 1.8, 6, 12, 18, $24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为相关物质 A 对照品溶液。

另按照上述方法分别配制浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 离子标准储备液。

1.3 样品溶液的制备

称取环磷酰胺样品 100.0 mg, 置 5 mL 量瓶中, 用超纯水溶解并稀释至刻度, 浓度为 $20.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分离柱: lonPac CS12A 阳离子交换色谱柱 (250 mm×4.0 mm); 流动相: 0.16% 甲烷磺酸溶液; 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 25°C ; 进样量: $25 \text{ }\mu\text{L}$; DIONEX CSRS 300 4 mm 抑制器; 检测方式: 电导检测器。

在该色谱条件下, 5 种标准离子混合溶液和环磷酰胺样品的色谱图见图 1。

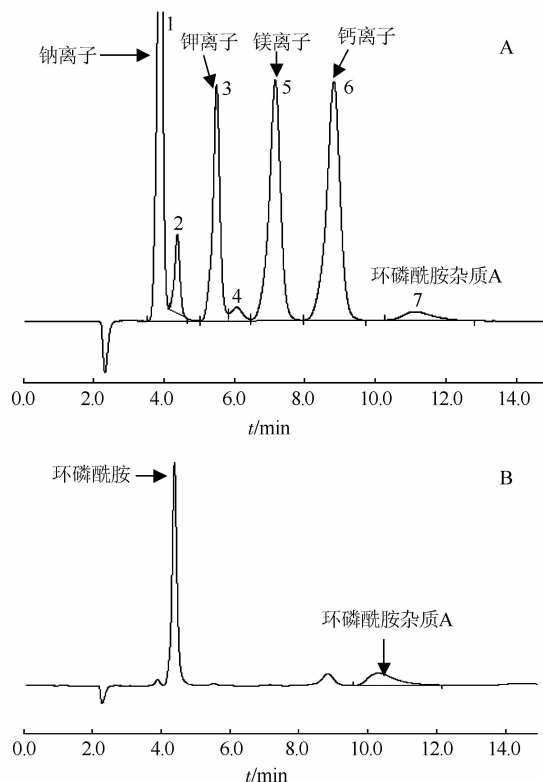


图1 色谱分离图

A-5 种标准离子混合溶液; B-环磷酰胺样品溶液

Fig 1 ICP chromatograms

A-standard mixture of five ions; B-sample of cyclophosphamide

2.2 线性范围、相关系数、最低检测限和最低定量限

环磷酰胺相关物质 A 在 $1.8\sim 24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积的线性关系良好, 线性方程为: $y=0.0019x-0.0006$, $r=0.9992$; 最低检出限为 $0.54 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 定量下限为 $1.8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 方法精密度、回收率和重复性

对相关物质 A 对照品溶液 ($12, 24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行不同次加样回收率测定, 计算降解产物 A 的回收率及 RSD, 结果见表 1。从表 1 中可以看出该方法具有很好的准确度和精密度。间隔 24 h 后, 用同样的方法, 在相同条件下对相关物质 A 对照品溶液 ($12, 24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行再次测定, 并计算降解产物 A 的回收率及 RSD%, 结果见表 1, 测定的 2 组相关物质 A 的检出量的平均值及回收率差值很小 ($<1.5\%$), 说明该方法具有较好的重复性。

表 1 方法回收率和精密度结果

Tab 1 The results of the recovery and precision

第 1 批次	检出量/ μg·mL ⁻¹	加入量/ μg·mL ⁻¹	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
降解产物 A	11.438 6		96.86		
	11.872 2	11.809	100.54	98.85	1.86
	11.709 6		99.16		
	24.320 1		101.17		
	23.479 7	24.041	97.67	99.56	1.77
	24.005 0		99.85		
第 2 批次	检出量/ μg·mL ⁻¹	加入量/ μg·mL ⁻¹	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
降解产物 A	11.685 2		99.20		
	11.582 3	11.779	98.32	97.45	2.31
	11.170 5		94.83		
	24.042 6		100.01		
	23.782 6	24.039	98.93	99.81	0.79
	24.151 6		100.47		

2.4 样品有关物质检查

按上述方法分析了 6 批样品相关杂质 A 的含量,与相关检出标准比较,得到相应的检测结果见表 2。将离子色谱法测得的结果与药典 USP 薄层色谱法的测得结果进行比较,6 批环磷酰胺样品中杂质 A 使用薄层色谱法均未检出,而离子色谱法能定量检出相关杂质 A,且检出结果符合相关规定(限度≤0.06%)。

表 2 环磷酰胺样品杂质 A 检测结果(n=3)

Tab 2 The results of the related substance A analysis in sample(n=3)

批 号	相关物质 A	
	IC-TCD	TLC
120301	0.05	未检出
120302	0.01	未检出
120303	0.01	未检出
120304	0.01	未检出
120305	0.02	未检出
120306	0.04	未检出

3 讨论

环磷酰胺相关降解产物 A 化学结构式见图 2,从对降解杂质 A 的结构分析,该化合物在酸性介质中可以阳离子形态存在,因此可用阳离子交换色谱分离,采用热导检测器进行检测分析。

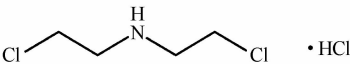


图 2 环磷酰胺相关物质 A 分子结构

Fig 2 The structure of cyclophosphamide related substance

由于样品中包含一些常见阳离子,如 K⁺,Na⁺,Mg²⁺和 Ca²⁺等,在选择分离条件时,必须考虑这些常见离子的干扰问题。本实验选用常规阳离子交换色谱柱 IonPac CS12A 为分离柱。实验结果表明甲烷磺酸水溶液(浓度范围 1.2~2 mL·L⁻¹)作为流动相时,相关产物 A 及 K⁺,Na⁺,Mg²⁺和 Ca²⁺阳离子在 IonPac CS12A 柱上能够较好分离,且相关产物 A 的保留时间在 K⁺,Na⁺,Mg²⁺和 Ca²⁺ 4 种离子之后,但当淋洗液浓度<1.2 mL·L⁻¹时,样品中相关产物 A 的保留时间会超过 20 min。流速超过 1.0 mL·min⁻¹和甲烷磺酸浓度>1.6 mL·L⁻¹时,基线会变差,原因可能是超过抑制器所设置的抑制电流所致。当流速为 1.0 mL·min⁻¹,淋洗液的浓度为 1.6 mL·L⁻¹ 甲烷磺酸时,常见阳离子和相关物质在 12 min 之内得到很好分离,且降解产物 A 与相邻峰分离度≥1.2。

目前环磷酰胺杂质分析主要依据 USP 药典中的方法进行检测分析,所采用的是薄层色谱法:以含有荧光指示剂 0.25 mm 硅胶板为吸附剂,二氯甲烷-冰醋酸-甲醇-水(50:25:15:12)为展开剂,四甲基联苯为显色液,目测环磷酰胺试液与对照标准品在同一水平位置上具有相同的斑点,方法的检出限为 12 μg·mL⁻¹,为定性和半定量检测法^[12]。该方法还受分析者的视力、实践经验以及目标检测物斑点清晰程度的影响,分析的可靠性不够^[19-20]。本研究通过选择合适的阳离子交换色谱柱和流动相,优化色谱分析条件,建立了离子交换色谱-抑制电导检测器用于环磷酰胺相关物质 A 的定量检测方法,其中环磷酰胺相关物质 A 的定量下限为 1.8 μg·mL⁻¹,检测限浓度为 0.54 μg·mL⁻¹,均远远优于传统的薄层色谱法。本方法的专属性好、精密度和准确度高,适合环磷酰胺相关物质 A 的检验分析。

REFERENCES

[1] GAO P, QIAN J L, LIU C X, et al. Establishment of an immunosuppressive animal model induced by cyclophosphamide in mice [J]. J Lab Med(环境与职业医学), 2004, 21(4): 314-318.

[2] YE R G, LI X P. Study of improved cyclophosphamide on treating lupoid nephritis [J]. Chin J Nephrol(中华肾脏病杂志), 1991, 7(3): 147-149.

[3] HU W X, CHEN H P, TANG Z, et al. Clinical and pathological study of mycophenolate mofetil(MMF) therapy versus intermittent cyclophosphamide pulse treatment in severe diffuse proliferative lupus nephritis (DPLN) [J]. Chin J

- Nephrol Dial Transplant(肾脏病与透析肾移植杂志), 2000, 9(1): 3-8.
- [4] GUAN Z Z, ZHAO T P, SUN Y, et al. Phase II clinical study of ifosfamide in lymphomas and small cell lung cancer [J]. Chin J Cancer (癌症), 1992, 11(3): 174-176.
- [5] BOTTINI , GENERALI D, BRIZZI M P, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22): 3623-3628.
- [6] NGAN H Y S, CHOO Y C, CHEUNG M, et al. A randomized study of high-dose versus low-dose cis-platinum combined with cyclophosphamide in the treatment of advanced ovarian cancer [J]. Chemotherapy, 2009, 35(3): 221-227.
- [7] CHEN Z L, GUAN M, TANG Y, et al. Analysis on 638 cases of adverse reaction induced by Chinese patent drugs [J]. Chin J Integr Med(中国中西医结合杂志), 2004, 24(9): 852-852.
- [8] XIA Y Y, ZHAN S Y. Systematic review of anti-tuberculosis drug induced adverse reactions in China [J]. Chin J Tuberc Respir Dis(中华结核和呼吸杂志), 2007, 30(6): 419-423.
- [9] ROBERT M, ANIDINO M, DEGEORGE D, et al. Representing establishment of allowable concentrations of genotoxic impurities in drug substance and product [J]. Winter Toxicology Forum, 2005, 1: 5-8.
- [10] KROES R S, KLEINER J, RENWICK A. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment [J]. Toxicol Sci, 2005, 86(2): 226-230.
- [11] GAO Y X, LIU T G, NIU C Q. Determination and related substances of minocycline hydrochloride by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2006, 23(1): 64-67.
- [12] USP35-NF30(2009) [S]. 2009: 1387.
- [13] MOU S F, LIU K N, DING X J. Ion Chromatography Method and Its Application(离子色谱方法及应用) [M]. 2nd Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [14] DE BORBA B M, ROHRER J S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection [J]. J Chromatogr A, 2007, 1155(1): 22-30.
- [15] ZHAO S, WANG J, YE F, et al. Determination of uric acid in human urine by ion chromatography with conductivity detector [J]. Chin Chem Letters, 2011, 22(3): 342-345.
- [16] ZHU Y, GUO Y, YE M, et al. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1085(1): 143-146.
- [17] LI J R, YE M L, ZENG X L, et al. Determination of fumaric acid in pharmaceutical intermediate by ion chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(4): 419-421.
- [18] ZHOU J L, SHI B, LUO L, et al. Determination of residual sulfur dioxide in *Fritillaria thunbergii* Miq. by ion-chromatography method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 1025-1028.
- [19] DA S L. Introduction to Chromatography (色谱学导论) [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1999.
- [20] Sun Y Q, WANG Y Z, LIN L M, et al. Modern Chromatography and Its Application in Medicine (现代色谱法及其在医药中的应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House Press, 1998.

收稿日期: 2013-06-06

GC 测定马来酸伊索拉定原料中二氧六环和 2-甲氧基乙醇残留量

闻宏亮, 彭茗, 宋冬梅, 杨永健(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 目的 建立 GC 测定马来酸伊索拉定原料中二氧六环和 2-甲氧基乙醇的残留量。方法 样品以二甲基甲酰胺溶解, 色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管柱(30 m×0.53 mm, 1 μm), 检测器为氢火焰离子化检测器, 柱温为程序升温, 初始柱温为 40℃, 进样口温度为 200℃, 检测器温度为 250℃。结果 二氧六环和 2-甲氧基乙醇分别在 7.6~76 μg·mL⁻¹ 和 1.0~10 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好(*r* 分别为 0.999 9 和 0.998 4), 平均回收率分别为 94.7%(RSD=3.7%) 和 98.2%(RSD=3.9%), 检测限分别为 0.9 μg·mL⁻¹ 和 0.3 μg·mL⁻¹。结论 本方法灵敏度高、准确度好, 可用于马来酸伊索拉定原料中二氧六环和 2-甲氧基乙醇的残留量测定。

关键词: 马来酸伊索拉定; 溶剂残留; 二氧六环; 2-甲氧基乙醇; 气相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)05-0570-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.014

Determination of Residual of 1,4-Dioxane and 2-Methoxyethanol in Irsogladine Maleate Bulk Drug by GC

WEN Hongliang, PENG Ming, SONG Dongmei, YANG Yongjian(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)