

氨磷汀 HPLC 测定方法的比较

祁飞飞¹, 廉明明¹, 孟庆伟^{1*}, 李红梅², 董述祥²

(1. 大连理工大学精细化工国家重点实验室; 2. 大连美罗药业股份有限公司, 辽宁大连 116012)

摘要: 比较了美国药典 (USP 31) 和中国部颁标准中氨磷汀的 HPLC 测定法。美国药典采用不同比例的乙腈 - 水 (含全氟丁基磺酸或三氟乙酸) 作为流动相, 中国部颁标准则采用甲醇 - 3.5 mmol/L 辛烷磺酸钠水溶液 (磷酸调节 pH 3.0) 为流动相。两法均用外标法测定氨磷汀含量。测定有关物质时, 美国药典用外标法测定硫醇含量, 归一法测其它有关物质; 中国部颁标准则用自身对照法测定有关物质含量。

关键词: 氨磷汀; 硫醇; 有关物质; 高效液相色谱; 测定

中图分类号: TQ460.7⁺2; O657.7⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255 (2009) 06-0444-03

Comparison of HPLC Analysis of Amifostine

QI Fei-fei¹, LIAN Ming-ming¹, MENG Qing-wei^{1*}, LI Hong-mei², DONG Shu-xiang²

(1. State Key Lab. of Fine Chemicals, Dalian University of Technology; 2. Dalian Merro Pharmaceutical Ltd., Dalian 116012)

ABSTRACT: The HPLC methods for determination of amifostine, validated by USP 31 and China Ministry of Public Health Department were comparatively described. Amifostine and its related substances were determined with the mobile phase of different rate of acetonitrile-water (containing nonafluorobutane sulfonic acid or trifluoroacetic acid) and methanol-3.5 mmol/L octanesulfonic acid sodium solution (pH 3.0), respectively. The content of amifostine was determined by the external standard method for two methods. For USP 31, the content of thiol was determined by the external standard method and other related substances were determined by the normalization method. For China Department method, the related substances were determined by self contrast method.

Key Words: amifostine; thiol; related substance; HPLC; determination

氨磷汀 (amifostine, **1**) 化学名为 (S)-2- [(3-氨基) 氨基] 乙基硫代磷酸三水化合物 (图 1), 是首个泛细胞保护剂^[1]。临床主要用于肿瘤患者化疗过程中保护正常细胞, 减轻放疗引起的不良反应, 增加机体对高剂量化疗的耐受性, 提高肿瘤治疗的效果。

1 易水解和氧化, 产物分别为 2- [(3-氨基) 氨基] 乙基硫醇 (**2**) 和二 (N-氨基-2-乙胺基)-二硫醚 (**3**) (图 1), 临床上会引起头晕、乏力、恶心、呕吐等不良反应^[2]。

为提高 **1** 质量控制标准, 本研究对比研究了美

国药典 (USP) 31 版和我国部颁标准 (WS1-(X-467) - 2003Z) 中 **1** 的检测方法。

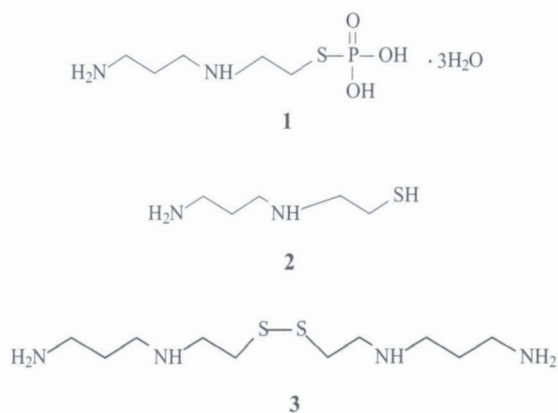


图 1 **1**、**2** 和 **3** 的化学结构式

1 仪器与试剂

日本 Jasco 高效液相色谱仪, 包括 UV1575 型检测器和 LC-Net II 工作站。

收稿日期: 2008-10-24

作者简介: 祁飞飞 (1982-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 药物工程。

通信联系人: 孟庆伟 (1964-), 男, 教授, 硕士生导师, 从事药物合成研究。

Tel: 0411-39893898

E-mail: mengqw@chem.dlut.edu.cn

1 对照品 (批号 20060715, 纯度 99.72%) 和 2 二盐酸盐对照品 (批号 20080407, 纯度 99.80%) 均为本室自制; 1 样品 (大连美罗药业股份有限公司, 批号 071016、071017、071024)。

2 1 的方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 溶液配制

部颁标准中 1 对照品溶液和 1 供试品溶液: 精密称取 1 对照品和样品各 0.40 g, 置 50 ml 量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀。

USP 31 版中 1 对照品溶液和 1 供试品品溶液: 精密称取 1 对照品和样品各 0.30 g, 置 10 ml 量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀。

2.1.2 色谱条件

部颁标准: 色谱柱 C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相 甲醇 - 3.5 mmol/L 辛酸磺酸钠水溶液 (磷酸调至 pH 3.0) (50 : 50), 流速 0.7 ml/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μ l。

USP 31 版: 色谱柱 C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm,

5 μ m), 流动相 乙腈 - 水 (1.0 ml 全氟丁基磺酸溶于 1200 ml 水) (10 : 90), 检测波长 220 nm, 进样量 10 μ l。

2.1.3 计算方法

USP 31 和部颁标准均采用外标法计算 1 含量。

2.1.4 方法比较

取“2.1.1”项下的各对照品溶液和供试品溶液, 分别按 USP 31 版和部颁标准的色谱条件进样测定, 结果见表 1, 色谱图见图 2。

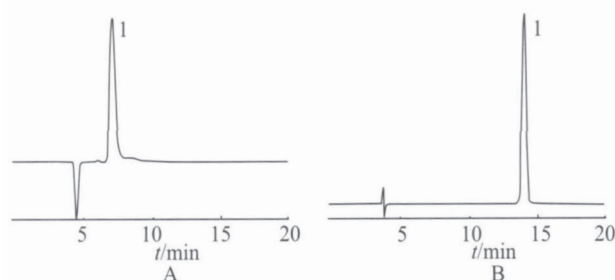


图 2 部颁标准(A)和 USP 31 版(B)测定 1 对照品溶液的 HPLC 图

表 1 USP 31 版和部颁标准方法的 1 含量测定结果¹⁾

批号	保留时间 / min	含量 / %	柱效	拖尾因子	容量因子
1 对照品 20060715	14.258 (7.242)	99.72 (99.72)	12 500.34 (1 567.33)	0.92 (1.54)	2.44 (0.51)
	14.217 (7.225)	99.72 (99.72)	12 480.64 (1 593.75)	0.93 (1.56)	2.43 (0.51)
1 样品	071016	14.200 (7.275)	12 473.17 (1 580.14)	0.94 (1.54)	2.42 (0.52)
	071017	14.225 (7.183)	12 396.70 (1 574.38)	0.94 (1.55)	2.43 (0.50)
	071024	14.117 (7.242)	11 023.08 (1 549.75)	0.99 (1.55)	2.40 (0.51)

注: ¹⁾ 括号内外分别为按部颁标准和 USP 31 版测得结果

由表 1 可见, 两法测定 1 含量, 1 对照品和样品的保留时间一致; 柱效和拖尾因子均满足测定; 而 USP31 版的 1 峰容量因子 (大于 0.5) 较部颁标准的更适合。

2.2 1 有关物质测定

2.2.1 溶液配制

部颁标准的 1 供试品溶液: 取 1 适量, 加水溶解并稀释制成 6 mg/ml 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取 2 ml, 置 100 ml 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 作为对照溶液。

USP 31 版中 1 供试品溶液: 精密称取 1 样品 50 mg, 置 1 ml 量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀, 5 $^{\circ}$ C 贮存备用。

2 对照品溶液: 精密称取 2 二盐酸盐对照品 12.4 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀, 5 $^{\circ}$ C 贮存备用。

2.2.2 色谱条件

部颁标准: 同“2.1.2”项下的色谱条件。

USP 31 版: 色谱柱 C_{18} 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相 乙腈 - 水 (1.0 ml 全氟丁基磺酸和 0.4 ml 三氟乙酸溶于 1200 ml 水, 三乙胺调至 pH 2.5) (32 : 68), 流速 1.0 ml/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 220 nm (2), 进样量 10 μ l。

2.2.3 计算方法

部颁标准: 采用自身对照法。有关物质测定的供试品溶液的色谱图如显杂质峰, 各杂质峰 (溶剂

峰除外)面积之和,不得大于对照溶液主峰的面积(2.0%)。

USP 31 版:采用外标法。以式 1 计算 1 的有关物质 2 的含量,以式 2 计算其它有关物质含量。

$$(134.24/207.17) \times 100 \times (c/W) (r_u/r_s) \quad \text{式 1}$$

式中: C —2 二盐酸盐对照品的浓度, mg/ml;
 W —1 样品重量, mg; r_u 和 r_s 分别为 1 样品溶液和 2 对照品溶液中 2 的峰面积; 134.24 和 207.17 分别为 2 和 2 二盐酸盐的分子量。

$$100 r_i/r_v \quad \text{式 2}$$

式中, r_i 和 r_v 分别为 1 样品中其它杂质的峰面积和 1 样品中 1 的峰面积。

2.3 方法比较

按部颁标准测定,所得 3 批 1 样品的有关物质含量分别为 0.232%、0.221% 和 0.248%。色谱图

见图 3。

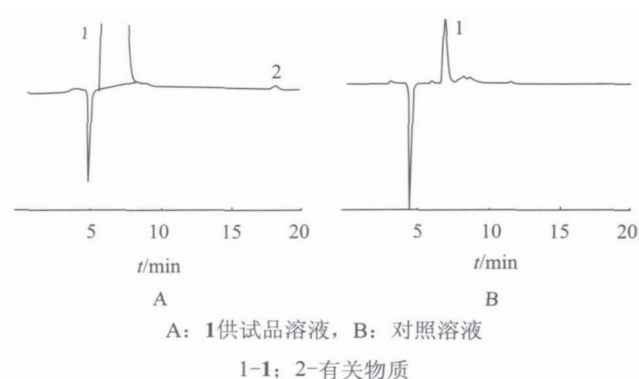


图 3 部颁标准测定 1 有关物质的 HPLC 图

按 USP 31 版方法, 3 批样品中 2 的含量分别为 0.026%、0.021% 和 0.020%, 其它有关物质的总量分别为 0.108%、0.099% 和 0.091%。色谱图见图 4。

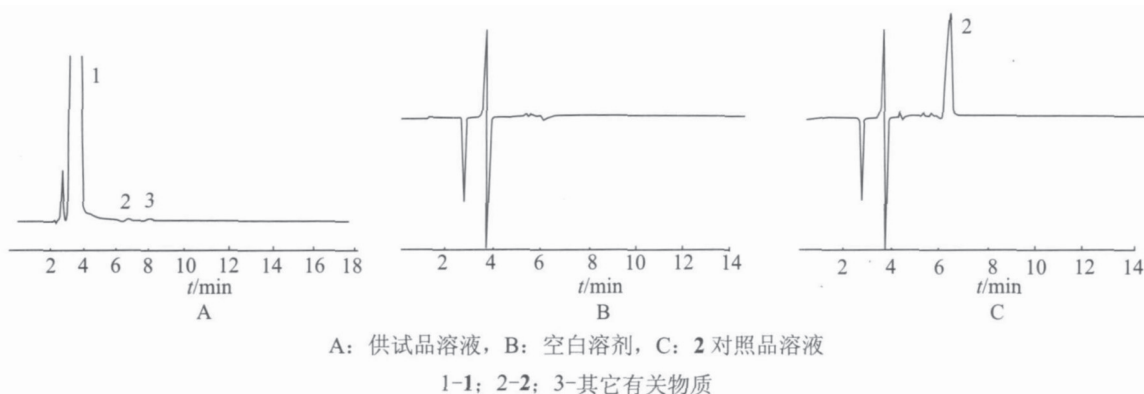


图 4 USP 31 版测定 1 有关物质的 HPLC 图

USP 31 版方法能同时测定 1 中 2 和其它有关物质含量(如图 4 所示),各峰间分离度均大于 2, 2 的柱效大于 4 208,拖尾因子 0.88, 2 二盐酸盐对照品的容量因子 0.63(大于 0.5)。图 4 中峰 3 为其它有关物质,拖尾因子为 1.23。

USP 31 版方法能分离 2 个有关物质峰,而部颁标准只能分出 1 个有关物质峰且保留时间在主峰的 2 倍之外,不符合 2005 年版中国药典附录 V D 要求。USP 31 版方法更适合于 1 质量控制。

3 讨论

部颁标准采用相同的流动相,操作简单。规定 1 的有关物质总量不超过 2.0%,而未对样品中 2 的含量作定量检测。

USP 31 版采用不同的流动相,方法较繁琐。

但可测定 1 中 2 和其它有关物质的含量,有关物质总量不超过 0.3%,除 2 外,其它杂质总量不超过 0.1%。故相对更全面。

对 1 制剂有关物质的检测,USP 31 版要求控制 1 中 2 和 3 的含量,且采用与 1 原药有关物质测定时相同的流动相,即可分离测定 2 和 3。而我国部颁标准未要求检测 3,且检测 1 原药有关物质的流动相未能分离 1 制剂中的有关物质 3。

参考文献:

- [1] 高怡瑾编译. 化/放疗病人的细胞保护剂——氨磷汀[J]. 国外医学——儿科学分册, 2000, 27(5): 266-267.
- [2] Brizel Dm, Wasserman TH, Henke M, et al. Phase-III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(19): 3339-3345.