

2015年版《中国药典》环磷酰胺有关物质检测方法的验证与改进[△]

雷成康^{1*}, 郭玲^{2#} (1.西安市食品药品检验所, 西安 710054; 2.陕西师范大学生命科学院, 西安 710119)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5122-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.25

摘要 目的:改进环磷酰胺有关物质的检测方法。方法:对2015年版《中国药典》收载的环磷酰胺有关物质检测的薄层色谱法(TLC)进行验证,并对该方法进行改进,以环磷酰胺有关物质A、B、C、D对照品为对照,以二氯甲烷-冰乙酸-甲醇-水(50:25:15:12, V/V/V/V)为展开剂,以茚三酮试液为显色剂,进行有关物质检测试验及方法学验证。结果:原TLC法不仅无法检测到环磷酰胺有关物质B、C、D,且操作过程烦琐,不够环保。改进后的TLC法对环磷酰胺有关物质A的检测限约为0.05 μg,对有关物质B、C、D的检测限约为0.1 μg;方法专属性试验结果表明,环磷酰胺与各有关物质之间互不干扰,分离度良好。结论:改进的TLC法具有简便、环保、灵敏度高的优点,可用于环磷酰胺及其制剂的质量控制。

关键词 环磷酰胺;有关物质;薄层色谱法;改进

Validation and Improvement of the Detection Method for Cyclophosphamide Related Substances in Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition)

LEI Chengkang¹, GUO Ling² (1.Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China; 2.College of Life Sciences; Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the detection method for the related substances of cyclophosphamide. METHODS: The TLC for the detection method of the cyclophosphamide related substances in Chinese Pharmacopoeia (2015 edition) was verified; the TLC was improved with references of compound A, B, C, D, the expanding agent of dichloromethane-acetic acid-methanol-water (50:25:15:12, V/V/V/V) and the chromogenic agent of ninhydrin solution, and the detection test and methodology validation were conducted for the related substances. RESULTS: The original TLC can not detect the cyclophosphamide related compound B, C, D, and the operation process was cumbersome and not environmental protection. The detection limit of improved TLC for cyclophosphamide related compound A was 0.05 μg, and 0.1 μg for related compound B, C, D; specificity method test results showed that cyclophosphamide and the related compounds did not interfere with each other with a good separation. CONCLUSIONS: Improved TLC has the advantages of simplicity, environmental protection and high sensitivity, which can be used for the quality control of cyclophosphamide and its preparations.

KEYWORDS Cyclophosphamide; Related compound; TLC; Improvement

- 症的随机对照临床研究[J]. 中医药现代化, 2013, 15(5): 1074.
- [28] 南红梅. 用补肾健骨汤治疗腰椎间盘突出症的效果分析[J]. 当代医药论丛, 2015, 13(14): 180.
- [29] 平佃辉, 姚新苗. 中药益骨口服液与小针刀结合治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 中国民族民间医药, 2011, 11(3): 136.
- [30] 王增辉, 郑燕芬. 中药自拟活血方联合物理牵引治疗急性腰椎间盘突出临床观察[J]. 中国中医急症, 2014, 23(5): 933.
- [31] 夏晓娜, 翁良波. 中医补肾法联合针灸治疗老年腰椎间盘突出症52例[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 945.
- [32] 周平, 王伯清, 付谦. 壮腰活血汤治疗腰椎间盘突出症疗效观察[J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(6): 367.
- [33] 罗永岚, 李畅. 自拟补肾祛瘀活血方治疗治疗腰椎间盘突出症[J]. 中国中医药咨询, 2011, 3(10): 157.
- [34] 杨谦祥. 自拟补肾通痹汤治疗腰椎间盘突出症40例[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(8): 46.
- [35] 王超明. 自拟补肾壮骨活血汤加牵引治疗腰椎间盘突出症128例[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(2): 141.
- [36] 楚志高, 杨德俊. 自拟活血通络汤治疗腰椎间盘突出症的临床观察[J]. 中医药导报, 2010, 16(2): 28.
- [37] 周利民, 符积勤. 自拟通督补肾方治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 中医药导报, 2014, 20(7): 127.
- [38] 钱永刚, 侯萍. 自拟通络活血汤治疗急性腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(6): 28.
- [39] 孙新波, 孙文聪. 自拟养血活血行气止痛丸加骶管注射治疗腰椎间盘突出[J]. 河南外科学杂志, 2012, 18(2): 40.
- [40] 梁万年. 医学科研方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 451.
- [41] Zhneg SW, Shaikh Atik B, Wang J, et al. Effect of supplementing qi, blood-activating and kidney-nourishing therapy on postoperative recovery in patients withlumber disc herniation[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2015, 35(1): 137.

△ 基金项目: 2014年国家药品计划抽验项目(No.111)

* 主管中药师, 硕士。研究方向: 药品检验及新药研发。电话: 029-85535543。E-mail: cklei168@163.com

通信作者: 实验师, 博士研究生。研究方向: 动物实验及药物分析。E-mail: glalguo@snnu.edu.cn

(收稿日期: 2015-12-30 修回日期: 2016-10-23)

(编辑: 申琳琳)

环磷酰胺 (Cyclophosphamide), 分子式 $C_7H_{15}N_2O_2P \cdot H_2O$, 化学名为 *P*-[*N,N*-双(β -氯乙基)]-1-氧-3-氮-2-磷杂环己烷-*P*-氧化物一水合物, 是目前临床应用非常广泛的抗肿瘤药。环磷酰胺主要以乙二醇胺为起始原料, 与氯化亚砷、三氯氧磷及氨基丙醇等经氯化、缩合、环合而成, 其生产工艺对温度及反应时间有严格要求。若其生产过程中的关键因素控制不当会引起有关物质含量显著增加; 另外, 若其长期贮藏于 30 °C 以上的环境中, 则易失去结晶水, 引起脱氯而呈黏稠状^[1]。

2015 年版《中国药典》(二部) 记载的检测环磷酰胺有关物质的方法为自身稀释对照的薄层色谱法 (TLC)^[2], 该方法不针对任何特定物质。而已知的环磷酰胺有关物质有 4 种, 分别为有关物质 A、B、C、D, 其中有关物质 A、B 既是工艺杂质也是降解杂质; 而有关物质 C、D 一般在贮藏过程中产生。据文献报道, 环磷酰胺有关物质 A 为二(2-氯乙基)胺盐酸盐, 具高毒性, 大鼠腹腔半数致死量 (LD_{50}) 为 100 mg/kg, 小鼠皮下 LD_{50} 为 20 mg/kg, 对人亦有致突变作用^[3]。其他 3 种环磷酰胺有关物质毒理学资料暂缺, 但就药品质量控制而言, 仍有必要对其含量进行检测。

经检索有关环磷酰胺质量研究文献^[3-9], 仅袁红露^[3]对环磷酰胺有关物质检测进行了研究, 但其方法为离子色谱法 (IC) 与高效液相色谱法 (HPLC) 两种方法的结合, 虽能较精确地定量, 但操作方法复杂, 检测成本较高, 实用意义稍低。笔者在承担国家食品药品监督管理局国家药品抽验科研项目 (环磷酰胺) 期间, 对原有的有关物质检测的 TLC 法进行了改进, 现将相关情况报道如下。

1 材料

1.1 仪器

预制硅胶 G 薄层板 (青岛海浪硅胶干燥剂有限公司, 批号: 20140326, 规格: 100 mm×200 mm, 厚度: 0.2~0.25 mm); BT25S 型十万分之一电子天平 (德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

注射用环磷酰胺样品 (共 47 批, 江苏某制药公司 22 批, 山西某制药公司 20 批, 吉林某制药公司 5 批, 规格均为 0.2 g); 环磷酰胺有关物质 A 对照品 (批号: 170475)、有关物质 B 对照品 (批号: 171256)、有关物质 C 对照品 (批号: 170476) 均购自加拿大 TRC 公司, 有关物质 D 对照品 (批号: F01375) 购自美国药典委员会, 标示纯度均 $\geq 98.0\%$; 茛三酮、无水甲酸、丙酮、丁酮、冰乙酸、甲醇、二氯甲烷、乙醇、盐酸、高锰酸钾、碘化钾、淀粉等均为分析纯, 水为自制实验用水。

2 方法与结果

2.1 原 TLC 法与方法学验证

2.1.1 原 TLC 法 取适量的注射用环磷酰胺样品, 用乙醇配制成一定质量浓度的溶液作为供试品溶液, 再将此溶液稀释 100 倍作为对照溶液。分别取以上两种溶液点于同一硅胶 G 薄层板上, 用丁酮-水-丙酮-无水甲酸 (80:12:4:2, *V/V/V/V*) 为展开剂, 展开, 在暖气流下晾干后, 于 110 °C 加热 10 min。在另一展开缸底放置一适宜容器, 加入适量高锰酸钾溶液和盐酸

以产生氯气, 将展开后的薄层板趁热放入此展开缸中, 盖上盖子。使薄层板与氯气接触 2 min, 取出薄层板, 将其置于冷气流中, 去除多余的氯气, 直至在点样处的下方滴 1 滴碘化钾淀粉溶液后, 薄层板仅显极浅的蓝色 (避免薄层板过长时间暴露于冷气流中)。喷以碘化钾淀粉溶液, 放置 5 min 后立即检视。供试品溶液如显杂质斑点 (除原点外), 其颜色不得深于对照溶液的主斑点 (1.0%)。

2.1.2 原 TLC 法的专属性验证 取注射用环磷酰胺样品及各有关物质对照品适量, 以乙醇配制环磷酰胺质量浓度为 20 mg/ml 及有关物质 A、B、C、D 质量浓度为 20 μ g/ml 的混合溶液。按“2.1.1”项下色谱条件, 吸取上述混合溶液各点样 1、2、3、4、5 μ l, 依法展开并显色, 结果见图 1。

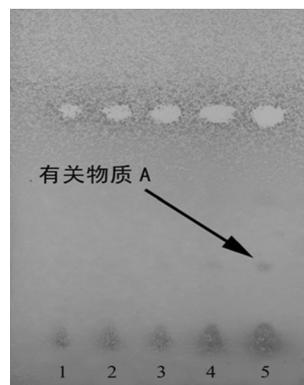


图 1 原方法的专属性验证薄层色谱图

1. 1 μ l; 2. 2 μ l; 3. 3 μ l; 4. 4 μ l; 5. 5 μ l

Fig 1 TLC chromatograms of specificity verification by the original method

1. 1 μ l; 2. 2 μ l; 3. 3 μ l; 4. 4 μ l; 5. 5 μ l

结果显示, 原 TLC 法仅能检出环磷酰胺有关物质 A, 而有关物质 B、C、D 均未能检出。而未能检出环磷酰胺有关物质 B、C、D 的原因是, 展开剂丁酮-水-丙酮-无水甲酸 (80:12:4:2, *V/V/V/V*) 仅能展开有关物质 A, 有关物质 B、C、D 基本停留在原点未展开, 呈现为一混合斑点, 其 R_f 值均为 0。

2.1.3 原 TLC 法存在的问题 原 TLC 法不仅无法检测到已知的环磷酰胺有关物质 B、C、D, 且操作过程异常烦琐, 费时费力, 其过程中还使用了国家管制试剂 (高锰酸钾、盐酸、丙酮、丁酮均为易制毒试剂) 并生成有毒有害物质 (氯气)。

2.2 改进后的 TLC 法与方法学验证

2.2.1 改进后的 TLC 法 取注射用环磷酰胺样品适量, 以 50% 甲醇制成环磷酰胺质量浓度为 20 mg/ml 的供试品溶液; 取供试品溶液 1 ml, 置于 200 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。另取各有关物质对照品适量, 以 50% 甲醇分别配制有关物质 A、B、C、D 质量浓度为 20 μ g/ml 的溶液, 作为对照品溶液。取上述 3 种溶液各 5 μ l, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以二氯甲烷-冰乙酸-甲醇-水 (50:25:15:12, *V/V/V/V*) 为展开剂, 展开约 10 cm, 取出, 晾干, 喷以茛三酮试液, 于 105 °C 加热至斑点显色清晰, 立即检视。供试品溶液色谱中如显杂质斑点, 其颜色不得深于相应的对照品溶液斑点 (0.1%), 其他斑点颜色不得深于对照溶液的主斑点 (0.5%)。色谱见图 2。

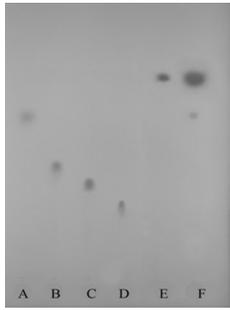


图2 改进后方法的薄层色谱图

A.有关物质A对照品溶液;B.有关物质B对照品溶液;C.有关物质C对照品溶液;D.有关物质D对照品溶液;E.对照溶液;F.供试品溶液

Fig 2 TLC chromatograms of improved methods

A.reference substance solution of related substance A; B.reference substance solution of related substance B; C.reference substance solution of related substance C; D.reference substance solution of related substance D; E.reference solution; F.test sample solution

2.2.2 检测限考察 精密称取环磷酰胺有关物质A、B、C、D对照品各适量,以50%甲醇分别溶解并制成1 ml约各含1 μg的溶液。按“2.2.1”项下色谱条件,吸取上述溶液各点样1、2、3、4、5 μl,依法展开并显色,以目视能检出清晰斑点的最低量为检测限。结果,该方法对环磷酰胺有关物质A的检测限约为0.05 μg,对有关物质B、C、D的检测限约为0.1 μg。

2.2.3 专属性试验 取注射用环磷酰胺样品及各有关物质对照品适量,以50%甲醇配制环磷酰胺质量浓度为20 mg/ml及有关物质A、B、C、D质量浓度为20 μg/ml的混合溶液。按“2.2.1”项下色谱条件,吸取上述混合溶液各点样1、2、3、4、5 μl,依法展开并显色。结果,采用改进后的TLC法,环磷酰胺的Rf值约为0.97,有关物质A的Rf值约为0.75,有关物质B的Rf值约为0.54,有关物质C的Rf值约为0.45,有关物质D的Rf值约为0.35。环磷酰胺与各有关物质之间分离良好。

2.2.4 空白试验 以50%甲醇溶液为空白溶液,按“2.2.1”项下色谱条件点样5 μl,依法展开并显色。结果,空白溶液未出现与各有关物质对照品溶液主斑点对应的斑点,也未出现其他斑点,表明空白溶液不会对本试验结果产生干扰。

2.2.5 样品验证 按“2.2.1”项下色谱条件和方法对收集到的47批注射用环磷酰胺样品进行有关物质检测。结果,仅部分样品检出了有关物质A,但均符合“2.2.1”项下的相关限度规定;同时均未检出有关物质B、C、D及其他有关物质。

3 讨论

环磷酰胺及其各种有关物质均为含氮有机物,分子中具

胺的结构,根据这个特点,采用茚三酮试液来显色,具有灵敏度高、直观、反应迅速的特点,且与原方法所用显色剂氯气相比,具有过程简便、环保的优点。本方法中,环磷酰胺有关物质A显色后呈橘黄色斑点,有关物质B、C、D显色后均呈紫红色斑点。

总结预试验及专属性试验研究结果,本方法的操作关键点为:(1)薄层板临用前须经105℃活化0.5 h;(2)展开剂及显色剂茚三酮试液均需临用新配;(3)展距以不超过10 cm为佳;(4)展开后取出薄层板,以微热风(40~50℃)迅速干燥,并及时喷以显色剂;(5)加热显色时间以5~8 min为宜,应随时观察,显色清晰后即可取出。

综上所述,本方法具有简便、环保、灵敏度高的优点,通过47批环磷酰胺制剂验证结果来看方法可行性较好,可用于环磷酰胺及其制剂的质量控制,并可供相关质量标准修订和提高时参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部药典注释[S]. 1990:310.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:586.
- [3] 袁红露.环磷酰胺原料药中有关物质的分析方法[D].杭州:浙江大学,2014.
- [4] 王淼,梁蔚阳.高效液相色谱法测定注射用环磷酰胺的有关物质和降解产物[J].中国生化药物杂志,2008,29(4):275.
- [5] 梁云爱,李见春,门孝英.环磷酰胺及其制剂的二阶导数差示脉冲极谱法定量研究[J].中国药学杂志,2001,36(9):620.
- [6] 卞晓岚,翟青.HPLC法测定复方环磷酰胺胶囊中环磷酰胺的含量[J].广东药学院学报,2004,20(5):491.
- [7] 刘澄凡,韩远乐,赵强,等.环磷酰胺的示波极谱法测定[J].分析测试学报,1994,13(5):48.
- [8] 王文辉,杨俊,陈瑶,等.超高效液相色谱-质谱法测定人体血浆中的环磷酰胺[J].光谱实验室,2011,28(6):2887.
- [9] 王燕琼,张顺国,徐涛,等.环磷酰胺注射液在玻璃瓶和PVC软输液袋中的稳定性考察[J].药学实践杂志,2010,28(5):361.

(收稿日期:2015-12-31 修回日期:2016-10-30)

(编辑:周 箐)

国家食品药品监督管理总局副局长孙咸泽出席“中非携手,提高医药产品可及性研讨会”

本刊讯 2016年11月22日,“中非携手,提高医药产品可及性研讨会”在上海召开,国家食品药品监督管理总局副局长孙咸泽出席会议并致辞。会议旨在落实2015年习近平主席在中非合作论坛约翰内斯堡峰会上关于“鼓励和支持中国企业赴非洲开展药品本地化生产,提高药品在非洲可及性”的重要指示精神,推动中非医药产业务实合作。

孙咸泽副局长表示,中国政府高度重视食品药品安全,正

在采取一系列监管改革措施和制度创新,提高药品的安全性和质量,从供给侧推动制药产业的结构调整和产业升级,从而为包括非洲在内的全球公共卫生事业做出贡献。

孙咸泽副局长强调,总局将积极推动中非药品监管合作,互通信息,衔接机制,在药品检验检测、质量标准、监督检查、药物警戒、上市许可等领域开展有效的国际间合作,共同切实保障供应链的安全。