

## 卡铂注射液未知杂质结构及其与辅料的相关性研究

金 薇, 江文明, 刘 茜, 高 旋, 张 叶, 郭 丹, 钱 敏, 任美婷, 杨永健\*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** 采用二维快速液相色谱-串联飞行时间质谱 (UPLC-QTOF) 对卡铂注射液中的未知杂质结构及其与辅料的相关性开展研究。一维采用苯基-己基硅烷键合硅胶色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 硫酸四丁基铵缓冲液 (pH 7.5)-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 二维采用快速液相色谱-串联飞行时间质谱 (UPLC-QTOF), HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱。在电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI+) 模式下, 采用 MS<sup>E</sup> 采集模式, 对待测未知杂质进行定性研究和分子量准确测定, 初步确定杂质的结构。通过加速稳定性实验以及 ICP-MS/MS、ICP-AES 考察杂质与主药和处方中辅料的相关性。结果显示, 某企业处方中加入了辅料依地酸二钠, 反而与主药卡铂相互作用, 生成含铂有关物质, 从而导致卡铂降解产生更多的 1,1-环丁烷二羧酸。因此, 本研究表明依地酸二钠的添加加剧了卡铂注射液有关物质的增加, 辅料添加的合理性值得进一步关注。

**关键词:** 卡铂注射液; 含铂杂质; 依地酸二钠; 1,1-环丁烷二羧酸; 二维液相色谱-串联飞行时间质谱  
**中图分类号:** R917      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870 (2018) 04-0604-05

## Study on the structure of an unknown impurity in carboplatin injection and the relationship with the excipient

JIN Wei, JIANG Wen-ming, LIU Qian, GAO Xuan, ZHANG Ye, GUO Dan, QIAN Min, REN Mei-ting, YANG Yong-jian\*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** The study was designed to establish a 2D UPLC-QTOF method to extrapolate the structure of an unknown substance in carboplatin injection and its relationship with the excipient. By using phenyl-hexyl column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of tetrabutylammonium sulfate buffer (pH 7.5) and acetonitrile in gradient elution mode, an unknown impurity in carboplatin injection was found and quantitatively determined. Then a 2D UPLC-QTOF, HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was employed to confirm the molecular weight and the structure of the unknown impurity (electrospray ionization source, positive ion mode, MS<sup>E</sup> mode) with mobile phase consisting of 0.1% formic acid and acetonitrile. The relationship among impurities, API and excipient was investigated by accelerated stability test with ICP-MS/MS, ICP-AES. Results showed that disodium edetate in the formulation interacted with carboplatin producing an unknown impurity containing platinum, and induced the increase of 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid. The research should be done on the rationality of the addition of disodium edetate in such injections containing heavy metals.

**Key words:** carboplatin injection; impurity containing platinum; disodium edetate; 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid; 2D-LC-MS-QTOF

收稿日期: 2017-11-14; 修回日期: 2018-01-09.

基金项目: 国家重大新药创制-化药制剂质量评价关键技术研究课题 (2015ZX09303001).

\*通讯作者 Tel: 86-21-50798190, E-mail: yongjianyang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1126

卡铂为第二代铂类抗癌药物, 由美国 Bristol-Myers Squibb 公司、英国癌症研究所和 Johnson Matthey 公司于 20 世纪 80 年代合作开发。卡铂上市产品有两种剂型: 注射用卡铂和卡铂注射液。中国药典 2010 年版仅收载注射用卡铂, 中国药典 2015 年版不再收载注射用卡铂, 而收载了卡铂注射液<sup>[1,2]</sup>。

卡铂的 CAS 号为 41575-94-4, 分子式为  $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ , 相对分子质量为 371.26, 化学名为顺式-1,1-环丁烷二羧酸二氨铂, 结构式见图 1。

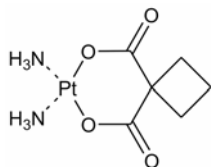


Figure 1 Structure of carboplatin

卡铂一般以六氯铂酸钾为起始原料, 制得顺-二碘二氨铂, 然后与 1,1-环丁烷二羧酸盐反应制得<sup>[3]</sup>。卡铂原料及注射剂中含量的测定方法研究较多<sup>[4-7]</sup>, 而杂质的研究较少<sup>[8]</sup>。在中国药典 2015 年版之前, 卡铂注射液的质量标准中尚未有控制 1,1-环丁烷二羧酸的量。

由于 1,1-环丁烷二羧酸为卡铂合成过程的重要起始物, 也是其已知降解产物, 本研究采用中国药典 2015 年版高效液相色谱法对某企业的不同规格卡铂注射剂进行了考察。该企业生产的小规格 (10 mL : 50 mg) 卡铂注射液样品中的 1,1-环丁烷二羧酸含量都约为大规格 (10 mL : 100 mg) 卡铂注射液样品的 2 倍, 而同一企业生产的注射用卡铂中 1,1-环丁烷二羧酸的量则远小于两种规格卡铂注射液样品中的 1,1-环丁烷二羧酸的量。结果表明该企业生产的卡铂注射液没有注射用卡铂稳定。因此, 有必要进一步通过考察卡铂注射液中其他有关物质的量及卡铂注射液的稳定性来评价处方工艺的合理性。

## 材料与amp;方法

**仪器** 1260 型液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); ACQUITY 2D UPLC<sup>®</sup>-Xevo G2-XS QTOF (美国 Waters 公司); iCAP6300 电感耦合等离子体发射光谱仪 (美国 Thermo 公司); 8800 ICP-MS/MS (美国 Agilent 公司)。

**对照品与试剂** 卡铂对照品 (含量 98.7%, 批号 100322-201102) 由中国食品药品检定研究院提供; 1,1-环丁烷二羧酸对照品 (含量 99%, 批号 J1420001)、

依地酸二钠对照品 (含量 99.0%, 批号 F20071126) 由阿拉丁试剂公司提供; 水中铂 ( $1.000\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 批号 15A021) 由国家有色金属及电子材料分析测试中心提供。硫酸四丁基铵、磷酸、氢氧化钠为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为 Millipore 超纯水。

**试药** 样品均来源于 2015 年国家药品评价性抽验。卡铂注射液分别由企业 A (16 批次, 10 mL : 100 mg 和 10 mL : 50 mg) 和企业 B (3 批次, 15 mL : 150 mg) 提供, 注射用卡铂由企业 A 提供 (15 批次, 规格均为 100 mg), 均为 2015 年 10 月前生产, 均符合各自生产时现行有效的质量标准。

**液相色谱条件** 采用苯基己基硅烷键合硅胶色谱柱 ( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), 以 0.17% 硫酸四丁基铵缓冲液 (pH 7.5) 为流动相 A, 以 0.17% 硫酸四丁基铵缓冲液 (pH 7.5)-乙腈 (800 : 200) 为流动相 B, 进行梯度洗脱: 0~15 min 100% A; 15~30 min 100% A~100% B; 35~50 min 100% B。流速为  $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温为  $27\text{ }^\circ\text{C}$ , 进样温度为  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 检测波长为  $220\text{ nm}$ <sup>[9]</sup>, 进样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

**二维液相色谱串联质谱条件** 一维液相系统采用上述液相方法进行分离, 二维液相系统使用质谱兼容的流动相与 QTOF 相连, 将样品中待测杂质 (保留时间约 20~25 min) 切入二维进质谱检测。色谱柱为 HSS T3 ( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ), 柱温  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 流速  $0.6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 乙腈, 梯度: 切峰后 100% A 相冲洗 4 min, B 相 3 min 比例由 5%~80%。质谱条件: Xevo G2-XS QTOF, 离子化模式: ESI+, 毛细管电压: 2.5 kV, 源温度:  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 雾化气温度:  $500\text{ }^\circ\text{C}$ , 雾化气流速为  $900\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 采集模式为 MS<sup>E</sup>。软件: MassLynx 4.1/MassFragment。

**电感耦合等离子体原子发射光谱条件** 采用 Thermo iCAP6300 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-AES), 反射功率 1150 W, 载气流速  $0.60\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 在 214.4 nm 波长处测定铂的发射强度。

**电感耦合等离子体质谱条件** 采用 Agilent 8800 ICP-MS/MS, 反射功率 1550 W、载气流速  $0.9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 、采样深度 10 mm; 选取铂同位素 195 进行测定。

**供试品溶液** 分别精密量取卡铂注射液或转移注射用卡铂适量, 用水定量稀释或溶解后定量制成约含卡铂  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 摇匀, 作为液相和二维液相色谱串联质谱供试品溶液。

**加速实验溶液** 分别取企业 A 生产的 3 批卡铂注射液 (规格均为  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 与 3 批注射用卡铂 (规格均为 100 mg) 于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  温度、75% 湿度的加速实

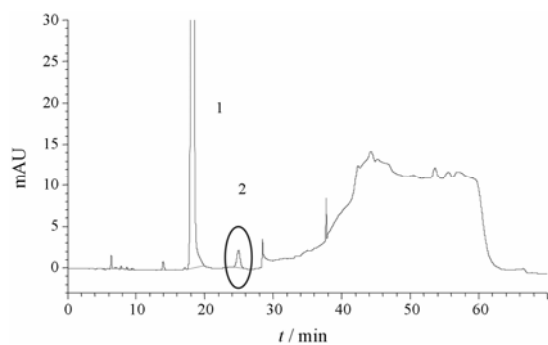
验条件下放置 1 个月。分别参照企业 A (含 EDTA) 与企业 B (不含 EDTA) 的处方, 制成含卡铂均为 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液作为卡铂注射液的模拟样品, 于 40 °C 温度、75% 湿度的加速实验条件下放置半个月。取上述样品分别用水定量稀释或溶解后定量制成约含卡铂 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 摇匀, 作为加速实验溶液。

## 结果

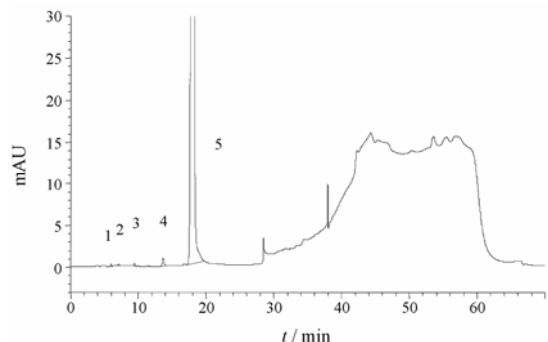
### 1 有关物质检查

按峰面积归一化法对卡铂注射液和注射用卡铂进行有关物质检查。企业 A 样品典型色谱图详见图 2 和 3。企业 A 的卡铂注射液未知有关物质测定结果见表 1。

由图 2 和表 1 可知, 企业 A 的卡铂注射液中均有一个相对保留时间 (RRT) 为 1.3 的未知杂质超过 0.5%, 且小规格 (10 mL : 50 mg) 注射液样品中该杂质的量均大于大规格 (10 mL : 100 mg) 注射液样品中该杂质的量, 约为 2 倍关系, 与 1,1-环丁烷二羧酸测得量趋势一致, 推测此两种杂质的含量具有一定的相关性。值得关注的是, 由图 3 还可知, 注射用卡铂样品中未检出 RRT 为 1.3 的未知杂质。且注射用卡铂样品单个有关物质测得值均小于 0.1%, 杂质总



**Figure 2** Typical chromatogram of the related substances in carboplatin injection. 1: Carboplatin 2: Maximum unknown impurity



**Figure 3** Typical chromatogram of the related substances in carboplatin for injection. 1–4: Impurities; 5: Carboplatin

**Table 1** Determination results of unknown impurities in carboplatin injection

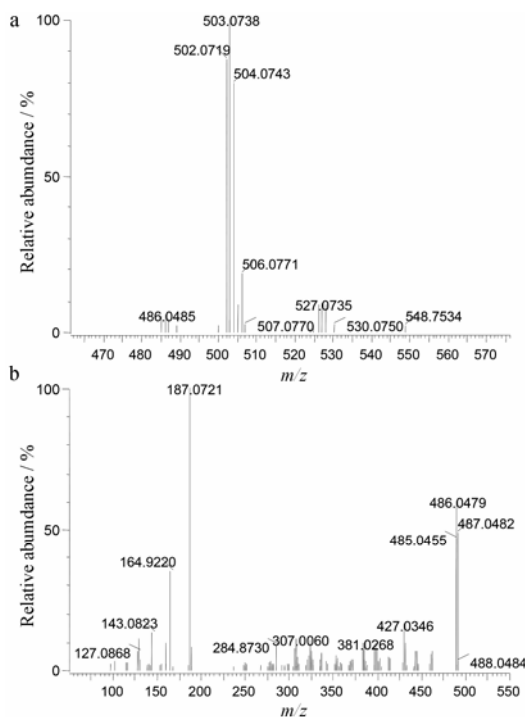
No.	Strength	Maximum unknown impurity/% (RRT = 1.3)	No.	Strength	Maximum unknown impurity/% (RRT = 1.3)
1	10 mL : 100 mg	0.57	9	10 mL : 100 mg	0.59
2	10 mL : 50 mg	1.34	10	10 mL : 100 mg	0.59
3	10 mL : 100 mg	0.56	11	10 mL : 50 mg	1.31
4	10 mL : 100 mg	0.56	12	10 mL : 50 mg	1.30
5	10 mL : 100 mg	0.60	13	10 mL : 100 mg	0.60
6	10 mL : 100 mg	0.72	14	10 mL : 100 mg	0.60
7	10 mL : 100 mg	0.56	15	10 mL : 50 mg	1.35
8	10 mL : 50 mg	1.34	16	10 mL : 50 mg	1.34

量均小于 0.3%。

### 2 未知杂质结构分析

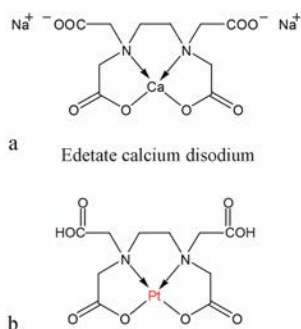
采用上述二维液相色谱串联质谱条件, 对卡铂注射液中单个最大特定未知杂质进行鉴定。卡铂注射液一维色谱图, 与图 2 结果一致。

**2.1 推测的相对分子质量和分子式** 将样品中待测杂质 (保留时间约 20~25 min) 切入二维进质谱检测。二维一级质谱给出的  $m/z$  为 502.07, 二级质谱给出的  $m/z$  为 485.05, 通过质量偏差和同位素分布, 软件推测  $m/z$  为 502.07 的可能分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Pt,  $m/z$  为 485.05 的可能分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Pt, C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Pt 为 C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Pt 的加铰峰, 详见卡铂注射液未知杂质一级和二级质谱图 (图 4)。



**Figure 4** MS spectra (a) and MS/MS spectra (b) of the unknown impurity ( $t_R = 25.3$  min)

**2.2 分子式为  $C_{10}H_{14}N_2O_8Pt$  的杂质的可能结构** 由软件给出的可能结构中含乙二胺四醋酸结构, 与企业 A 的卡铂注射液处方中添加有依地酸二钠相吻合。但是, 软件给出的可能结构还缺乏合理性, 根据二级质谱给出的信息对结构进行了初步的推断, 详见图 5。后续还需从卡铂的处方工艺, 卡铂注射液中依地酸二钠与卡铂的相互作用来进一步确证。



**Figure 5** Structure of edetate calcium disodium (a) and possible structure of the unknown impurity in carboplatin injection (b)

**2.3 卡铂注射液中未知杂质含铂的 ICP-AES 确认** 对单个最大未知杂质 (保留时间 21.9 min) 馏分收集液经稀释 5 倍后, 采用 Thermo iCAP6300 ICP-AES 在 214.4 nm 波长处测定铂的发射强度, 确定杂质中确实含有铂元素, 证明该杂质为卡铂的含铂有关物质。

**2.4 未知有关物质与依地酸二钠相关性确认** 取企业 B 卡铂注射液 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 不含依地酸二钠), 在注射液中加入依地酸二钠, 使其浓度为 0.02% (同企业 A 处方中量)、0.04% 与 0.1%, 在 40 °C 放置 1、2、3、4 天, 分别取样测定, 照上述液相色谱条件进样, 按峰面积归一化法计算, 结果详见表 2。

**Table 2** Study on the content of the unknown impurity at different ratio of EDTA-2Na (% ,  $n=2$ )

EDTA/%	Content/%			
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
0.02	0.2	0.37	0.61	0.7
0.04	0.24	0.5	0.89	1.19
0.1	0.28	0.64	1.25	1.88

从结果可以看出, 卡铂注射液中加入依地酸二钠后, 很快就产生了此未知杂质, 且随着依地酸二钠浓度的增大而增加; 连续 4 天稳定性考察测定结果也表明, 此未知杂质随着时间亦会逐渐增加。

**2.5 加速实验** 实际样品与模拟样品的加速实验表明, 当处方中有依地酸二钠存在时, 依地酸二钠会加速主成分卡铂降解, 生成 1,1-环丁烷二羧酸, 同时生

成上述与依地酸二钠相关的含铂的化合物。

### 3 电感耦合等离子体质谱法定量测定

取企业 A 的 3 批卡铂注射液 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 按上述液相色谱条件进行测定, 进样  $100 \mu\text{L}$ , 收集 20.5~26.0 min 的流出液, 用水定量稀释至 25 mL, 采用 8800 ICP-MS/MS 测定铂的含量, 再乘以 502/195 计算未知杂质的准确含量, 结果详见表 3。

**Table 3** Comparison of the content of the unknown impurity using different method (% ,  $n=2$ )

Sample No.	Content / %	
	HPLC	ICP-MS/MS
1	1.48	2.12
2	1.43	2.02
3	1.43	2.05

峰面积归一化法是基于杂质与主药吸收强度一致, 由于未知杂质和卡铂结构不同, 在 220 nm 波长的吸收不可能完全一致, 峰面积归一化测定结果与 ICP-MS/MS 测定结果相比, 结果偏小。结果说明, 该杂质实际含量比峰面积归一化法测得值大 40% 左右。

## 讨论

比较处方工艺, 发现企业 A 卡铂注射液辅料含依地酸二钠, 而其注射用卡铂辅料为甘露醇, 含依地酸二钠的处方易产生含铂杂质, 而含甘露醇的处方中没有产生该含铂杂质。从企业 A 的 1,1-环丁烷二羧酸的测定结果, 可以推断 1,1-环丁烷二羧酸与处方工艺、辅料有一定关系。依地酸二钠的存在, 可能发生酸根替换会促进 1,1-环丁烷二羧酸的生成。

由于企业 A 两种规格卡铂注射液中都添加了相同量的依地酸二钠 ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 通过常规铜离子络合法和高效液相色谱法对注射液中依地酸二钠进行测定, 测得含量仅为处方量的 26%~30% 左右, 而通过离子色谱法测定钠离子间接测定依地酸二钠则均为处方量的 100% 左右。说明企业按照处方量投入了准确量的依地酸二钠, 但是依地酸二钠与卡铂注射液中的游离铂发生了络合反应或者依地酸二钠与主成分卡铂发生了置换反应, 使得测得的游离依地酸二钠减少, 而起始原料 1,1-环丁烷二羧酸的量则增加。

实际样品与模拟样品的加速稳定性实验表明, 当处方中有依地酸二钠存在时, 依地酸二钠会加速主成分卡铂降解, 生成 1,1-环丁烷二羧酸, 同时生成与依地酸二钠相关的含铂杂质。由于处方中依地酸二钠的量小于处方中卡铂或铂的量, 因此依地酸二钠

的量决定了该含铂杂质量的多少。

依地酸二钠在非金属药物注射液和滴眼液中通常用于螯合痕量或微量的重金属离子起到稳定剂作用,但依地酸二钠在卡铂这类含金属药物中并未起到稳定剂作用,反而会与其螯合对有关物质的增加产生影响。实验表明继续加大处方中依地酸二钠的量,该杂质量继续增加。根据中国药典 2015 年版四部 9102 药品杂质分析指导原则,对于表观含量在 0.1% 及其以上的杂质以及表观含量在 0.1% 以下的具强烈生物作用的杂质或毒性杂质予以定性或者确定其结构。

该杂质在原料、注射用卡铂和原研卡铂注射液中均未出现,为本次研究首次发现的含铂杂质。由于研究时所采集的样品当时执行的质量标准中还未控制 1,1-环丁烷二羧酸和单个未知杂质,建议相关企业进一步研究卡铂注射液处方中添加依地酸二钠的合理性,保证药品质量安全可靠。

致谢: Waters 公司王志英工程师对结构推断给予帮助和技术支持。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Vol 2. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 134–135.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 2. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 191–192.
- [3] Qin YN. Synthesis of carboplatin [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 1991, 22: 9–16.
- [4] Xu FH, Ou-Yan L, Liu YQ. ICP-AES determination of carboplatin in poly (1 actic-cooycolic acid) microspheres by ICP-MS [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26: 790–792.
- [5] Du CS, Chen C, Song XK, et al. Content determination and stability study of carboplatin injection [J]. J China Pharm (中国药房), 2011, 22: 442–444.
- [6] Yang SY, Xie XT, Ye QS, et al. Research progress of the HPLC method for anticancer platinum complexes [J]. Precious Metals (贵金属), 2011, 32: 89–97.
- [7] Mittal A, Chitkara D, Kumar N. HPLC method for the determination of carboplatin and paclitaxel with cremophor EL in an amphiphilic polymer matrix [J]. J Chromatogr B, 2007, 855: 211–219.
- [8] Liu WP, Que ZH, Yang YK, et al. The photolytical products of aqueous carboplatin solutions [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1996, 31: 72–74.
- [9] Committee on Japanese Pharmacopoeia. The Japanese Pharmacopoeia (English Edition) [S]. Supplement I, XVI ed. Tokyo: Yakuji Nippo Ltd, 2012: 2378–2379.