HPLC 法测定二丁酰环磷腺苷钙原料药中的有关物质

孙 珍，徐明明，严翠霞，郑璐侠*，邵 泓*
（上海市食品药品检验研究院，国家药监局治疗类单抗质量控制重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了 HPLC 法测定二丁酰环磷腺苷钙（**1**）原料药中的有关物质，分别为 2′-*O*- 单丁酰环磷腺苷钠（**3**）、N^6- 单丁酰环磷腺苷钠（**4**）、环磷腺苷（**5**）。采用 ODS Hypersil 色谱柱（4.6 mm×200 mm，5 μm），以 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液和甲醇（体积比 600 ∶ 400）为流动相，检测波长为 273 nm；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL/min。建立了加校正因子的主成分自身对照法测定 3 种已知杂质，确定了 **3**、**4**、**5** 相对主成分的校正因子，分别是 1.7、0.9、1.4。结果显示，二丁酰环磷腺苷钠（**2**）和 **3**、**4**、**5** 分别在 0.1 ～ 20、4 ～ 20、1 ～ 20、0.1 ～ 2 μg/mL 内线性关系良好。**3**、**4**、**5** 的平均加样回收率（*n*=2）分别为 101.0%、98.5%、99.7%，精密度 RSD（*n*=6）分别为 0.1%、0.2%、0.1%，重复性 RSD（*n*=6）分别为 1.5%、1.6%、2.5%。**3**、**4**、**5** 和 **1** 的检测限分别为 0.2、0.1、0.1、0.2 ng。该方法专属性好、准确度和灵敏度高，为 **1** 的质量研究提供了参考。

关键词：二丁酰环磷腺苷钙；HPLC；有关物质；加校正因子的主成分自身对照法
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)01-0101-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.013

Determination of Related Substances in Calcium Dibutyryladenosine Cyclophosphate Bulk Drug by HPLC

SUN Zhen, XU Mingming, YAN Cuixia, ZHENG Luxia*, SHAO Hong*
(*NMPA Key Lab. for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An HPLC method was established to determine the related substances in calcium dibutyryladenosine cyclophosphate (**1**) bulk drug, which were sodium 2′-*O*-monobutyryladenosine cyclophosphate (**3**), sodium N^6-monobutyryladenosine cyclophosphate (**4**) and adenosine cyclophosphate (**5**). The ODS Hypersil column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used, with 0.1 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution-methanol (600∶400) as the mobile phase. The detection wavelength was 273 nm, the column temperature was 30 ℃ and the flow rate was 1.0 mL/min. A main component self-compare with correction factor method was established to determine three known impurities, and the correction factors of impurities **3**, **4**, and **5** to the principal component were determined to be 1.7, 0.9, and 1.4, respectively. The results showed that it was linear for sodium dibutyryladenosine cyclophosphate (**2**), **3**, **4**, **5** in the ranges of 0.1 − 20, 4 − 20, 1 − 20, 0.1 − 2 μg/mL, respectively. The average recoveries (*n*=2) of **3**, **4** and **5** were 101.0%, 98.5%, and 99.7%, respectively, and the precision RSDs (*n*=6) were 0.1%, 0.2%, and 0.1%, respectively. The repeatability RSDs (*n*=6) were 1.5%, 1.6%, and 2.5%, respectively. The detection limits for **3**, **4**, **5**, and **1** were 0.2, 0.1, 0.1, and 0.2 ng, respectively. This method has good specificity, accuracy, and sensitivity, which can provide a reference for quality research of **1**.

Key Words: calcium dibutyryladenosine cyclophosphate; HPLC; related substance; main component self-compare with correction factor method

二丁酰环磷腺苷钙（calcium dibutyryladenosine cyclophosphate，**1**），作为第二信使环磷腺苷（**5**，CAMP）的类似物，参与调节细胞内的多种生理反应，可以激活 CAMP 依赖性激酶 A[1−2]，调节细胞的分裂、成熟和凋亡[3]，防止病理性心肌细胞增强因子激活[4]，因此在临床上主要用于治疗心肌病等

收稿日期：2023-3-22
作者简介：孙 珍（1987—），女，硕士，从事生化药品和生物制品的分析和质量研究。
通信作者：郑璐侠（1976—），女，主任药师，从事生化药品和生物制品的分析和质量研究与开发。
E-mail：zhengluxia@smda.sh.cn
邵 泓（1969—），女，主任药师，硕士生导师，从事生化药品和生物制品的分析和质量研究与开发。
E-mail：shaohong@smda.sh.cn

相关疾病[5]，在肝癌的治疗中也显示出巨大潜力[6]。**1** 收载于国家药品标准（第九册）和国家食品药品监督管理局标准（YBH21242006），目前国内外药典均未收载。

关于 **1** 原料药，国家药品监督管理局数据库中目前共有 2 家企业的 2 个批准文号。目前，国家药品标准未对 **1** 原料药中的有关物质进行控制。现有文献[7—9]方法主要针对其中 1 家产品，且采用自身对照的定量分析方法来计算杂质含量。本研究对目前在售的 2 家原料药企业的产品均进行了研究，建立了一种新的方法，采用加校正因子的主成分自身对照法测定 2 家企业生产的 **1** 原料药中的有关物质；该法可同时供含量测定用，以期为国家药品标准的水平提升提供技术参考。

1　仪器与试药

1200 型液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；XS205 型电子天平（瑞士梅特勒 - 托利多公司）。

二丁酰环磷腺苷钠（**2**）对照品（美国 Sigma 公司，含量 98%，批号 SLCH2409）；2′-*O*- 单丁酰环磷腺苷钠（**3**）对照品（美国 Biolog 公司，含量 100%，规格为每支 50 μmol，批号 003）；N^6- 单丁酰环磷腺苷钠（**4**）对照品（美国 Sigma 公司，含量 98.2%，批号 BCCC4307）；**5** 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 99.8%，批号 140709-201805）；**1** 原料药来自国内 2 家企业共 6 批样品（企业 1 的 3 批样品，批号分别为 210101、210102、210103；企业 2 的 3 批样品，批号分别为 C-201293、C-201294、C-201295）；甲醇、四甲基氢氧化铵、磷酸二氢钾、磷酸、盐酸、氢氧化钠、30%过氧化氢溶液均为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 ODS Hypersil 柱（4.6 mm×200 mm，5 μm）；流动相 0.1 mol/L 磷酸二氢钾溶液（含 1 mmol/L 四甲基氢氧化铵，用磷酸调至 pH 4.0）和甲醇（体积比 600 ∶ 400），等度洗脱；检测波长 273 nm；柱温 30 ℃；流速 1.0 mL/min；进样量 20 μL。

2.2　溶液配制

系统适用性溶液：取 **1** 原料药，以及 **3**、**4**、**5** 对照品各适量，加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 **1** 1 mg、**3** 0.025 mg、**4** 0.025 mg 与 **5** 0.025 mg 的混合溶液作为系统适用性溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 原料药 50 mg，置 50 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，制成每 1 mL 中约含 **1** 1 mg 的溶液。

对照溶液：精密量取供试品溶液 1 mL，置 200 mL 量瓶中，用流动相定容，摇匀即得。

3 对照品溶液：取一支 **3**，用流动相全量转移至 200 mL 量瓶中，用流动相定容，摇匀，即得 **3** 对照品贮备液；再精密量取 **3** 对照品贮备液适量，用流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含 **3** 0.02 mg 的溶液，即得 **3** 对照品溶液。

4 对照品溶液：取 **4** 约 20 mg，精密称定，置 200 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，即得 **4** 对照品贮备液；再精密量取 **4** 对照品贮备液适量，用流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含 **4** 0.01 mg 的 **4** 对照品溶液。

5 对照品溶液：取 **5** 约 20 mg，精密称定，置 200 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，即得 **5** 对照品贮备液；再精密量取 **5** 对照品贮备液适量，用流动相定量稀释制成每 1 mL 中约含 **5** 0.001 mg 的 **5** 对照品溶液。

空白溶液：取流动相作为空白溶液。

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验

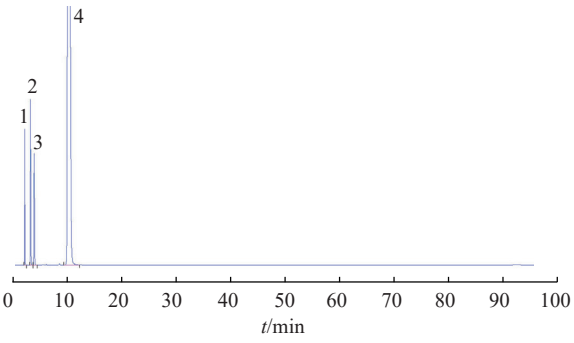
取“**2.2**”项下的系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，调整流动相比例使主成分色谱峰的保留时间不超过 14 min，记录色谱图至主成分色谱峰保留时间的 9 倍，结果如图 1 所示。可见，**5**、**4**、**3** 及主峰之间的分离度符合要求。

2.3.2　专属性考察

如图 1 所示，主成分、杂质等待测组分不受空白溶液的影响；主成分色谱峰的保留时间为 10.19 min，**5**、**4**、**3** 及主峰之间的分离度分别为 7.57、3.82、15.93，均大于 1.5，提示该法专属性良好。

2.3.3　破坏性试验

本研究对样品进行了酸、碱、氧化及高温条件



1—**5**；2—**4**；3—**3**；4—**1**。

图 1 系统适用性溶液的典型液相色谱图

Fig.1 Typical HPLC Chromatogram of the System Suitability Solution

的破坏性试验。取 **1** 原料药（批号 210101）0.2 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加流动相溶解并定容，摇匀，制成每 1 mL 中约含 **1** 2 mg 的溶液，作为样品贮备液，分别进行下列破坏性试验。

未破坏：取样品贮备液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，用流动相定容。

酸破坏：取样品贮备液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加入 1 mol/L 盐酸 2 mL，放置 30 min，再加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL，加流动相定容。

碱破坏：取样品贮备液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 0.7 mL，放置 1 min，再加入 0.5 mol/L 盐酸 0.7 mL，加流动相定容。

氧化破坏：取样品贮备液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加入 30%过氧化氢溶液 1 mL，放置 2 min，加流动相定容。

高温破坏：取样品贮备液 5 mL，于 100 ℃水浴中放置 2 h，放冷。

分别取上述破坏性试验样品，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果如图 3 所示。在上述色谱条件下，主成分峰与酸、碱、氧化和高温破坏产生的降解产物峰均能良好分离。

2.3.4 线性试验

分别取 **3**、**4**、**5** 对照品贮备液，用流动相配制为 **3** 质量浓度分别为 4、8、12.5、16.7、20 μg/mL，**4** 质量浓度分别为 1、5、10、15、20 μg/mL，**5** 质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2 μg/mL 的 **3**、**4**、**5** 线性试验溶液；**2** 用流动相溶解并配制成质量浓度分别为 0.1、0.5、1、1.5、2、4、8、10、16、20 μg/mL 的 **2** 线性试验溶液。分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以峰面积（*A*）为纵坐标、质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性拟合，分别得 **2**、**3**、**4**、**5** 的线性方程为 *A*=42 625*c*+0.058 3（*r*=0.999 9）、*A*=22 229.599 7*c*+2.935 5（*r*=0.999 9）、*A*=47 027.991 1*c*+1.703 0（*r*=0.999 9）、*A*=28 114.900 8*c*+0.009 5（*r*=0.999 9），说明 **2**、**3**、**4**、**5** 分别在 0.1 ～ 20、4 ～ 20、1 ～ 20、0.1 ～ 2 μg/mL 内线性关系良好。

由于 **2**、**3**、**4** 均为钠盐，而供试品中主成分和其他杂质均为钙盐，因此绘制回归曲线时浓度值均乘以钙盐和钠盐的相对分子质量比值进行换算。

2.3.5 精密度和重复性考察

取“**2.2**”项下的对照溶液和 **3**、**4**、**5** 对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样 6 针，结果显示，**1** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 0.2%，**3** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 0.1%，**4** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 0.2%，**5** 峰面积的 RSD（*n*=6）为 0.1%。

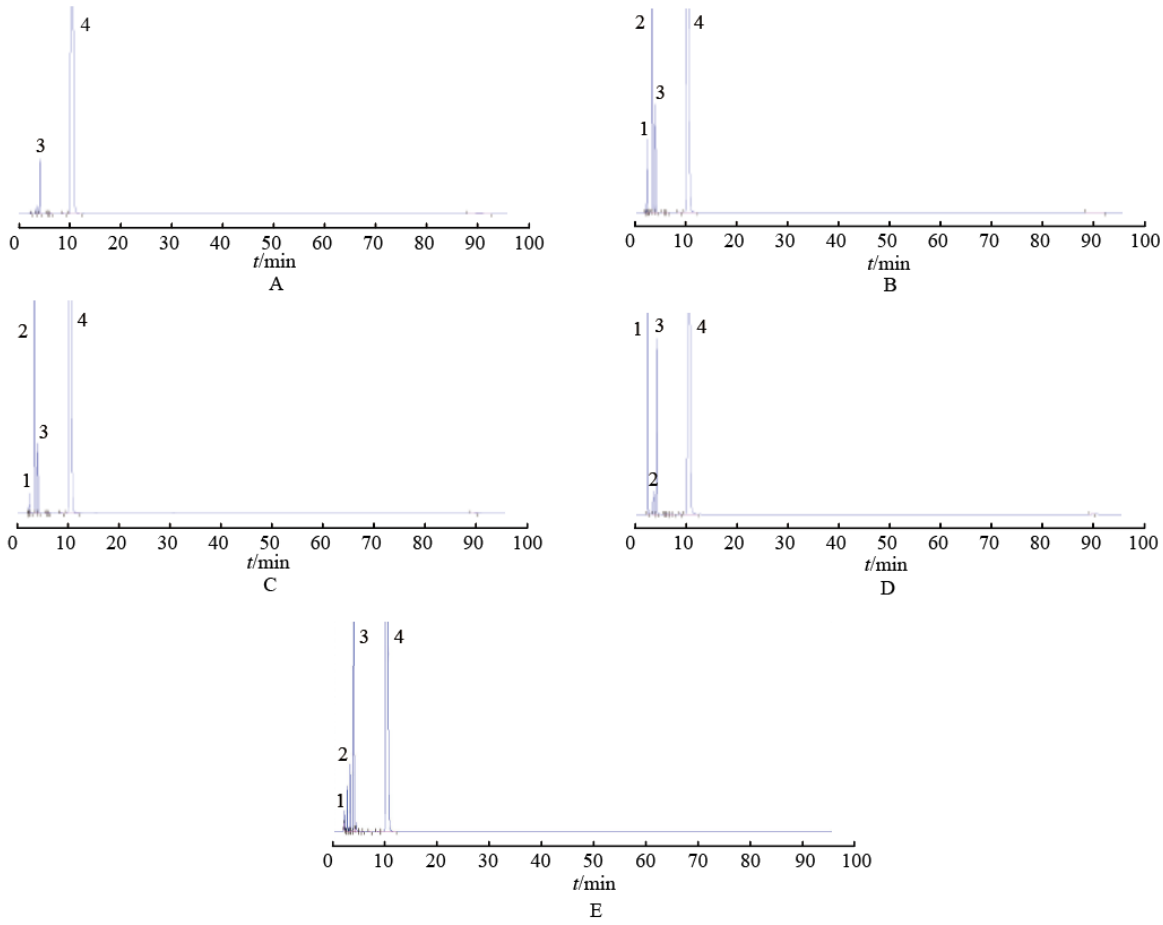
照“**2.2**”项下供试品溶液的配制方法，取 **1** 原料药（批号 210101），配制一式 6 份的供试品溶液，按加校正因子的主成分自身对照法计算。结果显示，**1** 含量均值（*n*=6）为 97.4%，RSD 为 1.2%；**3** 含量均值（*n*=6）为 2.108%，RSD 为 1.5%；**4** 含量均值（*n*=6）为 0.113%，RSD 为 1.6%；**5** 含量均值（*n*=6）为 0.052%，RSD 为 2.5%。

2.3.6 准确度考察

取 **1** 原料药（批号 210101）约 0.1 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，分别精密加入“**2.2**”项下的 **3**、**4**、**5** 对照品贮备液 20、10、1 mL，用流动相定容，摇匀即得。由外标法计算得 **3** 平均加样回收率（*n*=2）为 101.0%，**4** 平均加样回收率（*n*=2）为 98.5%，**5** 平均加样回收率（*n*=2）为 99.7%。

2.3.7 定量限和检测限

用流动相分别逐步稀释“**2.2**”项下的对照溶液和 **3**、**4**、**5** 对照品贮备液，配制一系列浓度的对照品溶液，以信噪比 10 ∶ 1 和 3 ∶ 1 作为定量限和检测限。结果显示，**3**、**4**、**5** 的定量限分别为 0.8、



A— 未破坏；B— 酸破坏；C— 碱破坏；D— 氧化破坏；E— 高温破坏。

1—**5**；2—**4**；3—**3**；4—**1**。

图 2　破坏性试验色谱图

Fig.2　Chromatograms of Stressing Tests

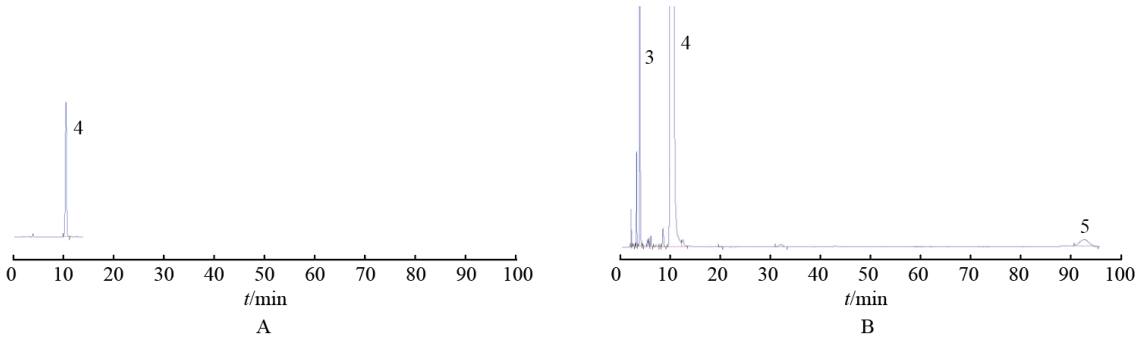
0.4、0.4 ng，检测限分别为 0.2、0.1、0.1 ng；**1** 的定量限和检测限分别为 0.8 和 0.2 ng。

2.4　定量分析方法

对杂质的定量分析，本研究比较了外标法和加校正因子的主成分自身对照法。由 2 名实验员分别独立进行试验，通过绘制主成分浓度和杂质浓度对其峰面积的回归曲线，以主成分回归直线斜率与杂质回归直线斜率的比值分别计算杂质 **3**、**4**、**5** 的校正因子，取这 2 名实验员所得的相对校正因子结果的均值，分别为 1.7、0.9、1.4。

2.5　样品测定

本研究同时采用外标法和加校正因子的主成分自身对照法计算 **3**、**4**、**5** 的含量，其他总杂质是其他未知杂质总和，采用不加校正因子的主成分自身对照法来计算。杂质含量的计算结果如表 1 所示。企业 1 的 2 批样品（批号 210101、20103）均符合规定，企业 1 的 1 批样品（批号为 210102）和企业 2 的 3 批样品均不符合规定。对照溶液和供试品溶液的典型图谱如图 3 和图 4 所示。对外标法与加校正因子的主成分自身对照法所得的结果进行比较，结果显示，企业 1 的 3 批样品中 3 种杂质的结果基本一致，而企业 2 的 3 批样品，由于样品中杂质含量较高，主成分含量较低，自身对照的峰面积较小，所以加校正因子的主成分自身对照法测得的杂质结



1—**5**；2—**4**；3—**3**；4—**1**；5—未知杂质。

图 3 对照溶液（A）和供试品溶液（B）的典型液相色谱图（企业 1，批号 210101）

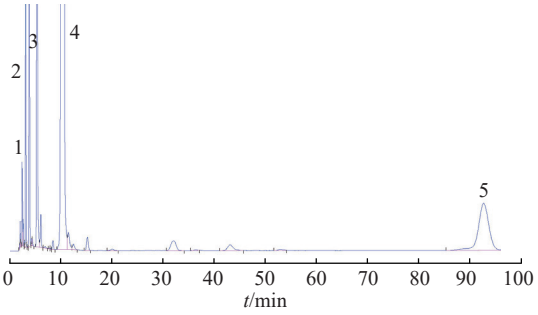
Fig.3 Typical HPLC Chromatograms of the Reference Solution (A) and the Test Solution (B) (Manufacturer 1, Lot No. 210101)

表 1 不同企业有关物质项目的测定结果 [1)]

Tab.1 Determination Results of the Related Substances of the Samples from Different Manufacturers

企业	批号	杂质**3**/%		杂质**4**/%		杂质**5**/%		其他总杂质/%	
		加校正因子的主成分自身对照法	外标法	加校正因子的主成分自身对照法	外标法	加校正因子的主成分自身对照法	外标法	不加校正因子的主成分自身对照法	外标法
企业1	210101	1.9	2.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.4	—
	210102	2.3	2.5	0.1	0.1	0.01	0.01	0.4	—
	210103	1.8	2.0	0.1	0.1	0.04	0.04	0.4	—
企业2	C-201293	4.7	3.2	1.1	0.7	0.05	0.03	5.4	—
	C-201294	4.6	3.1	1.0	0.6	0.04	0.02	6.2	—
	C-201295	5.1	3.4	0.8	0.5	0.04	0.03	5.1	—

注：[1)] 杂质 **3** ～ **5** 以及其他总杂质的限度分别为≤ 2.0%、≤ 1.0%、≤ 0.1%和≤ 0.5%。



1—**5**；2—**4**；3—**3**；4—**1**；5—未知杂质。

图 4 供试品溶液的典型液相色谱图

（企业 2，批号 C-201293）

Fig.4 Typical HPLC Chromatogram of the Test Solution (Manufacturer 2, Lot No. C-201293)

果较高，两种方法的结果存在一定差异。

3 讨论

通过供试品溶液分别考察了 3 根色谱柱［分别为色谱柱 1：Inertsil® ODS-SP 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），色谱柱 2：Hypersil GOLD™ 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），色谱柱 3：ODS Hypersil™ 柱（4.6 mm×200 mm，5 μm）］的分离效果，结果显示系统适用性试验的要求均能得到满足，杂质 **3**、**4**、**5** 也均可达到基线分离。考虑到液相色谱的承受压力，故选用柱长较短的色谱柱 3 来进行有关物质项目的测定。

在本研究中，系统适用性需要满足 2 个条件，一是调整流动相比例使主成分色谱峰的保留时间不得超过 14 min；二是记录供试品溶液的色谱图至主成分色谱峰保留时间的 9 倍。在研究过程中观察到，在 2 家企业供试品溶液的色谱图中，可见主成分出峰时间 9 倍的位置处均存在 1 个未知杂质峰，所以供试品溶液的色谱图运行时间需要保留至主成分色谱峰保留时间的 9 倍。而在系统适用性溶液色谱图中，需要调整流动相比例使主成分色谱峰的保留时间不超过 14 min，如果超过 14 min，最后的杂质峰

出峰太晚，会超出 9 倍保留时间。此外，还兼顾了样品的分析运行速度。另外，已知杂质，尤其 **3** 和 **4** 的对照品不易获得且具有引湿性。故本研究采用加校正因子的主成分自身对照法定量测定已知杂质含量，既兼顾了杂质定量分析的准确度，又考虑了对照品的不易获得性，使操作更便捷。

目前国家药品标准采用纸色谱法测定含量，而本法能检出更多未知杂质，且比现有文献多控制了 2 种已知杂质，即 **4** 和 **5**。本法专属性好、灵敏度高，对各已知杂质均可以有效分离，准确度高、精密度和重复性好，可同时测定主药和有关物质含量，为标准提升提供了技术参考。

参考文献：

[1] COOKE B A. Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **151**(1/2): 25-35.

[2] DE JONGE C J, HAN H L, LAWRIE H. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway [J]. *J Exp Zool*, 1991, **258**(1): 113-125.

[3] POWERS R D, PALEOS G A. Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte [J]. *J Reprod Fertil*, 1982, **66**(1): 1-8.

[4] HE T, HUANG J L, CHEN L, *et al*. Cyclic AMP represses pathological MEF2 activation by myocyte-specific hypo-phosphorylation of HDAC5 [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, **145**: 88-98.

[5] 吴　敏, 郭卫宾, 王　敏, 等. 二丁酰环磷腺苷钙治疗扩张型心肌病心力衰竭的临床观察[J]. 临床军医杂志, 2008, **36**(1): 69-70.

[6] MASSIMI M, RAGUSA F, CARDARELLI S, *et al*. Targeting cyclic AMP signalling in hepatocellular carcinoma [J]. *Cells*, 2019, **8**(12): 1511-1527.

[7] 饶印保, 郑金芳. 注射用二丁酰环磷腺苷钙含量高效液相测定法[J]. 江西中医学院学报, 2006, **18**(6): 36.

[8] 冯新侠, 闫平川. 高效液相色谱法测定二丁酰环磷腺苷钙及其冻干粉针的含量[J]. 海南医学院学报, 2008, **14**(1): 19-21.

[9] 霍　婷, 孙　凯, 汪　磊, 等. 二丁酰环磷腺苷钠的制备及其含量和相关物质的测定[J]. 中国生化药物杂志, 2015, **2**(35): 171-173.