离子色谱法同时测定醋酸阿托西班原料药及其注射液中的三氟乙酸与乙酸

严翠霞，张 颖，孙 珍，陈 钢，郑璐侠，邵 泓*

（上海市食品药品检验研究院，国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了离子色谱法同时测定醋酸阿托西班（**1**）原料药及其注射液中的三氟乙酸（**2**）与乙酸（**3**）。采用 Dionex IonPac^{TM} AS_{23} 型阴离子柱（4 mm×25 cm，5 μm），以 1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液和 4.0 mmol/L 碳酸钠溶液为淋洗液，流速为 1.0 mL/min，柱温为 30 ℃，进样量为 25 μL。结果显示，**2**、**3** 分别在 0.03 ～ 11.53 μg/mL、0.01 ～ 0.20 mg/mL 内线性关系良好，定量限分别为 1.4、5.1 ng，检测限分别为 0.7、2.5 ng。**1** 原料药中 **2** 和 **3** 的平均加样回收率（n=6）分别为 100.9%、101.8%，RSD 分别为 0.60%、0.74%；**1** 注射液中 **2** 和 **3** 的平均加样回收率分别为 100.4%、101.5%，RSD（n=6）分别为 0.86%、0.53%。建立的方法准确、灵敏度高、重复性好，可为 **1** 中 **2** 的用量控制以及 **2** 和 **3** 的同时测定提供科学依据。

关键词：离子色谱法；醋酸阿托西班；乙酸；三氟乙酸

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)01-0135-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.01.017

Simultaneous Determination of Trifluoroacetic Acid and Acetic Acid in Atosiban Acetate Bulk Drug and Its Injection by Ion Chromatography

YAN Cuixia, ZHANG Ying, SUN Zhen, CHEN Gang, ZHENG Luxia, SHAO Hong*

(*NMPA Key Lab. for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An ion chromatographic method was established for the simultaneous determination of trifluoroacetic acid (**2**) and acetic acid (**3**) in atosiban acetate (**1**) bulk drug and its injection. The Dionex IonPac^{TM} AS_{23} anion column (4 mm×25 cm, 5 μm) was adopted, and the 1.0 mmol/L sodium bicarbonate solution and 4.0 mmol/L sodium carbonate solution were used as eluents. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 25 μL. The results showed that it was linear for **2** and **3** in the ranges of 0.03 – 11.53 μg/mL and 0.01 – 0.20 mg/mL, respectively. The LOQs of **2** and **3** were 1.4 and 5.1 ng, and the LODs were 0.7 and 2.5 ng, respectively. The average recoveries (n=6) of **2** and **3** in **1** bulk drug were 100.9% and 101.8%, with the RSDs of 0.60% and 0.74%, respectively. The average recoveries (n=6) of **2** and **3** in **1** for injection were 100.4% and 101.5%, with the RSDs of 0.86% and 0.53%, respectively. The established method is accurate, sensitive and reproducible, which can provide a scientific basis for the dosage control of **2** in **1** and the simultaneous determination of **2** and **3** in **1**.

Key Words: ion chromatography; atosiban acetate; acetic acid; trifluoroacetic acid

醋酸阿托西班（atosiban acetate，**1**）为人工合成的一种由 9 个氨基酸组成的二硫键型环状多肽，是子宫肌层、蜕膜及胎膜上催产素受体的竞争性拮抗药，可阻止催产素在靶细胞上发挥作用，减少肌细胞内钙离子水平，松弛子宫平滑肌，临床上多用于治疗早产[1—3]，具有保胎效果好、长期使用不会

收稿日期：2022-06-09

基金项目：国家药典委员会课题(2021H058)、上海市研发公共服务平台项目(19DZ2294600)

作者简介：严翠霞(1983—)，女，硕士，从事生化药品与生物制品及药用辅料质量研究。

通信作者：邵 泓(1969—)，女，主任药师，硕士生导师，从事药物分析研究。

E-mail：shaohong@smda.sh.cn

改变子宫肌层对缩宫素的敏感性以及对母体和胎儿无不良反应等优点[3]。

经文献检索及企业调研可知[4]，**1** 的合成均采用固相合成法，肽链从固相树脂上分离的步骤中常以三氟乙酸（trifluoroacetic acid，**2**）作为裂解剂，而 **2** 的残留可能会对阿托西班的活性和稳定性造成一定的影响。故在阿托西班的精制过程中，常会通过转盐步骤将阿托西班转化为更稳定的乙酸盐形式。

2 的残留量和乙酸（acetic acid，**3**）含量是需要关注的多肽类药物关键质量属性。在国家药品监督管理局药品审评中心 2007 年发布的《合成多肽药物药学研究技术指导原则》及美国药典（USP 42）<1504> 合成多肽药物质量属性中，均对上述离子含量提出了研究控制的建议。

目前，**2** 和 **3** 的测定方法主要有离子色谱法、高效液相色谱法与气相色谱法[5—13]。其中，高效液相色谱法的灵敏度较低，且 **2** 和 **3** 对色谱柱损害较大[6]；气相色谱 - 氢火焰离子化检测法对 **2** 和 **3** 的响应值非常低，重复性差，且溶剂会干扰 **2** 的测定[9]；而离子色谱法是继高效液相色谱法后发展起来的液相分析技术，具有灵敏度高、重复性好、方便快捷等优势，在药物分析领域已得到广泛应用，主要用于检测合成反应中残留的无机酸、各类阴离子和阳离子含量。目前，国内外尚未见采用离子色谱法同时测定 **1** 原料药及其注射液中 **2** 和 **3** 的报道。

因此，本研究了建立离子色谱法同时测定 **1** 原料药及其注射液中的 **2** 和 **3**，该方法操作简便、灵敏度高、准确度好，能够对 **3** 及低浓度的 **2** 同时进行定性与定量分析，为 **1** 原料药及其注射液的质量控制提供了参考。

1　仪器与试药

Dionex ICS-5000 型离子色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，配有 ADRS 600 型 4 mm 阴离子抑制器和电导检测器）；1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司，配有紫外检测器）；XS205 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 原料药来自国内 5 家企业共 11 批次（生产企业及批号见表 1）；**1** 注射液来自国内 5 家企业共 12 批次（生产企业及批号见表 2）；**2** 对照品（美国 Tedia 公司，含量 100%，批号 17070340）；**3** 对照品（上海凌峰化学试剂有限公司，含量 100%，批号 20210323）；甲酸、氯化钠、硫酸钠与磷酸钠均为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱　Dionex IonPac^{TM} AS_{23} 型阴离子柱（4 mm×25 cm，5 μm）；保护柱　Dionex IonPac^{TM} AG_{23} 柱（4 mm×5 cm，5 μm）；淋洗液 1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液和 4.0 mmol/L 碳酸钠溶液的混合体系；抑制器 阴离子抑制器；抑制电流 25 mA；检测器 电导检测器；柱温　30 ℃；流速　1.0 mL/min；进样量　25 μL。

2.2　溶液配制

2 对照品贮备液：精密称取 **2** 对照品适量，用水定量稀释制成每 1 mL 中约含 **2** 50 μg 的溶液，即得。

3 对照品贮备液：精密称取 **3** 对照品适量，用水定量稀释制成每 1 mL 中约含 **3** 1.0 mg 的溶液，即得。

2 系列对照品溶液：精密量取 **2** 对照品贮备液适量，用水定量稀释制成每 1 mL 中分别含 **2** 0.025、0.1、0.5、1、5、10 μg 的溶液，即得。

3 系列对照品溶液：精密量取 **3** 对照品贮备液适量，用水定量稀释制成每 1 mL 中分别含 **3** 0.01、0.02、0.05、0.1、0.15、0.2 mg 的溶液，即得。

混合对照品溶液：精密量取 **2**、**3** 对照品贮备液各 1.0 mL，置同一 10 mL 量瓶中，用水定容，摇匀即得。

原料药供试品溶液：取 **1** 原料药适量，精密称定，加水溶解并定量稀释，制成每 1 mL 中含 **1** 1.0 mg 的溶液，即得。

制剂供试品溶液：精密量取 **1** 注射液 3.0 mL，置 20 mL 量瓶中，用水定容，摇匀即得。

2.3　方法学验证

2.3.1　专属性试验

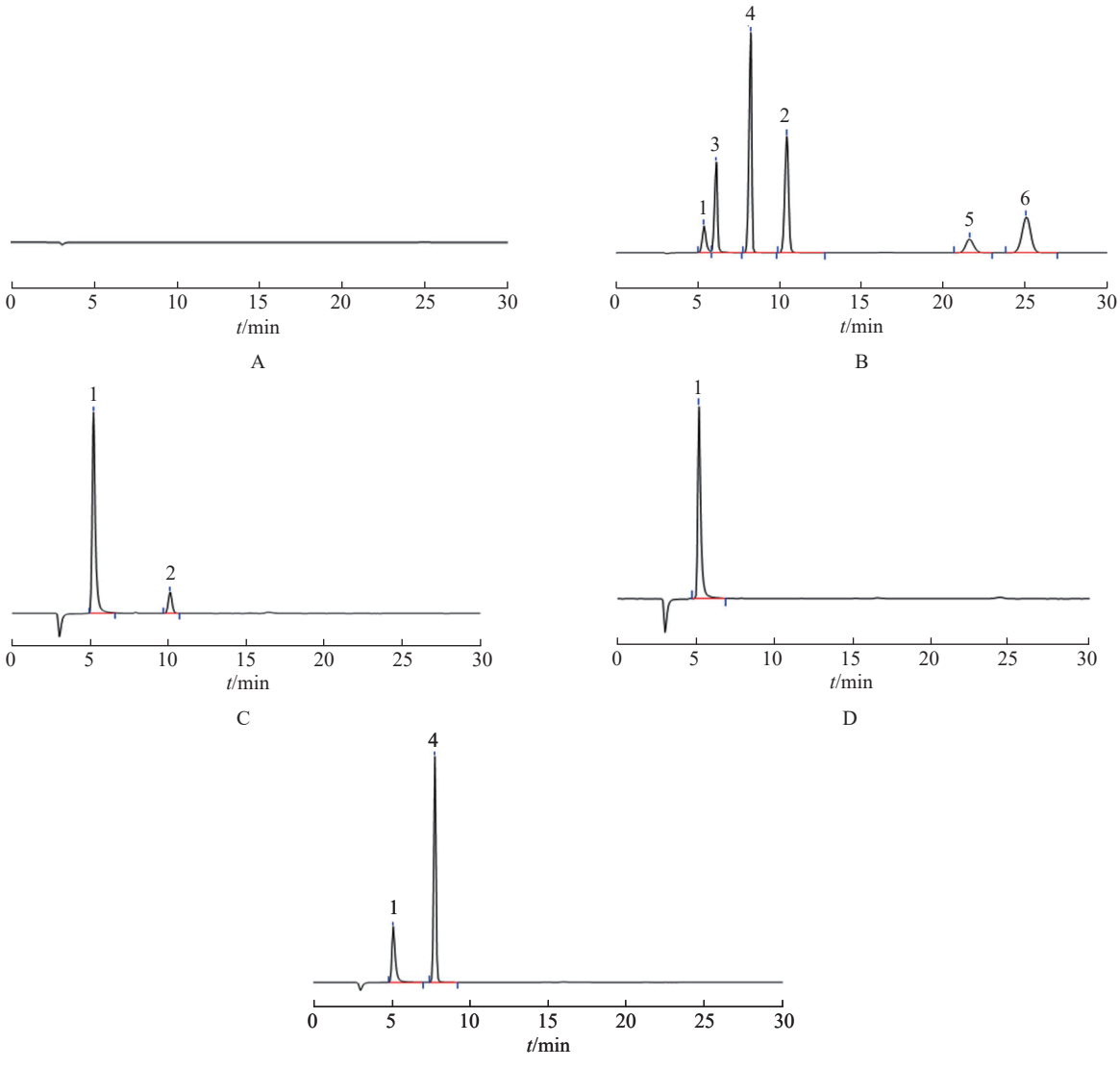
分别取 **3**、甲酸、氯化钠、**2**、磷酸钠与硫酸钠适量，精密称定，加水溶解并定量稀释制成每 l mL

中含 **3**、甲酸根离子（$HCOO^-$）、氯离子（Cl^-）、**2**、磷酸根离子（PO_4^{3-}）和硫酸根离子（SO_4^{2-}）各约为 0.1、0.1、0.1、0.3、0.1、0.1 mg 的混合溶液，即得系统适用性溶液。分别精密量取空白溶液（水）、系统适用性溶液，以及“**2.2**”项下的混合对照品溶液、原料药供试品溶液与制剂供试品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。

结果如图 1 所示，在空白溶液（水）色谱图中，无其他离子干扰测定；由系统适用性溶液色谱图可见，环境中可能存在的甲酸根离子（$HCOO^-$）、氯离子（Cl^-）、磷酸根离子（PO_4^{3-}）和硫酸根离子（SO_4^{2-}）对 **3** 根离子（CH_3COO^-）和 **2** 根离子（CF_3COO^-）的测定均无干扰，各峰间的分离度均大于 1.5；由原料药与制剂供试品溶液色谱图可见，杂质峰对 **3** 根离子（CH_3COO^-）和 **2** 根离子（CF_3COO^-）的测定均无干扰。

2.3.2 线性试验

精密量取“**2.2**”项下的 **2**、**3** 系列对照品溶液，



A—空白溶液；B—系统适用性溶液；C—混合对照品溶液；D—原料药供试品溶液；E—制剂供试品溶液。

1—CH_3COO^-；2—CF_3COO^-；3—$HCOO^-$；4—Cl^-；5—PO_4^{3-}；6—SO_4^{2-}。

图 1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatograms

分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以质量浓度 *c* 为横坐标、峰面积 *A* 为纵坐标，进行线性回归。结果显示，**2**、**3** 分别在 0.03 ～ 11.53 μg/mL 和 0.01 ～ 0.20 mg/mL 内线性关系良好，线性方程分别为 *A*=36.680*c* – 0.001 5（*r*=0.999 8）和 *A*=15.023*c*+0.035 9（*r*=0.999 4）。

2.3.3　定量限与检测限

精密量取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，用水逐级定量稀释，按“**2.1**”项下的色谱条件进样测定，记录色谱图。按信噪比（*S*/*N*）分别为 10 和 3 计算定量限与检测限。结果显示，**2** 和 **3** 的定量限分别为 1.4、5.1 ng，检测限分别为 0.7、2.5 ng。

2.3.4　精密度试验

精密量取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录色谱图。结果显示，**2** 与 **3** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.4%、0.1%，说明精密度良好。

2.3.5　重复性试验

取同一批 **1** 原料药（批号 CY52201102）与同一批 **1** 注射液（批号 2030200304），分别按“**2.2**”项下方法平行制备 6 份原料药供试品溶液与制剂供试品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，**1** 原料药中 **2** 和 **3** 的平均含量分别为 0、6.0%，RSD（*n*=6）分别为 0、3.2%；**1** 注射液中 **2** 和 **3** 的平均含量分别为 0、7.1%，RSD（*n*=6）分别为 0、0.5%，表明该方法的重复性良好。

2.3.6　稳定性试验

精密量取“**2.2**”项下的混合对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件，分别于制备后 0、2、4、8、12、16、24、48、72 h 进样测定。结果显示，**2** 和 **3** 峰面积的 RSD（*n*=9）分别为 0.9%和 1.6%，说明混合对照品溶液在 72 h 内的稳定性良好。

2.3.7　加样回收率试验

精密称取 **1** 原料药 50 mg，共 6 份，分别置 100 mL 量瓶中，再分别精密加入 **3** 对照品贮备液 5 mL 和 **2** 对照品贮备液 10 mL，用水定容，摇匀即得原料药加样回收率溶液。精密量取 **1** 注射液 1.5 mL，共 6 份，分别置 20 mL 量瓶中，再分别精密加入 **3** 对照品贮备液 1 mL 和 **2** 对照品贮备液 2 mL，用水定容，摇匀即得制剂加样回收率溶液。

取同一批 **1** 原料药（批号 CY52201102）与同一批 **1** 注射液（批号 2034200404），分别按上述方法制备原料药加样回收率溶液与制剂加样回收率溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果表明，原料药供试品溶液中 **2** 和 **3** 的平均加样回收率分别为 100.9%、101.8%，RSD（*n*=6）分别为 0.60%、0.74%；制剂供试品溶液中 **2** 和 **3** 的平均加样回收率分别为 100.4%、101.5%，RSD（*n*=6）分别为 0.86%、0.53%。

2.4　样品测定

取 5 家企业的 11 批 **1** 原料药与 5 家企业的 12 批 **1** 注射液，分别按“**2.2**”项下方法制备原料药供试品溶液与制剂供试品溶液，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，结果如表 1 和表 2 所示，可见测定结果均符合限度要求。

表 1　1 原料药中 2 和 3 的测定结果

Tab.1　Determination Results of **2** and **3** in **1** Bulk Drugs

生产企业	批号	**2**	**3**/%
A	S01820200901	未检出	6.4
	S01820200902	未检出	6.3
	S01820200903	未检出	6.3
B	CP-009-20190801	未检出	6.7
	CP-009-20190802	未检出	7.2
	CP-009-20190901	未检出	7.5
C	CY52201102	未检出	6.0
D	2001001	未检出	5.9
	2010035	未检出	5.5
	2010036	未检出	6.0
E	ATXB-I-2006002	未检出	7.6

3　讨论

3.1　系统适用性溶液的选择

在方法摸索和文献调研中发现，**3** 根离子和 **2** 根离子易受到氟离子、甲酸根离子的干扰。另外，考虑到环境中常见的其他无机阴离子，如甲酸根离子、氯离子、磷酸根离子、硫酸根离子，均可能对 **3** 根离子与 **2** 根离子的测定产生干扰[14]，故选择上述阴离子制备系统适用性溶液，并要求系统适用性

表 2 1 注射液中 2 和 3 的测定结果

Tab.2 Determination Results of **2** and **3** in **1** for Injection

生产企业	批号	**2**	**3**/%
A	30201001	未检出	7.2
	31201101	未检出	7.1
	31200603	未检出	6.9
C	2034200404	未检出	7.2
	2034200904	未检出	6.9
	2030200304	未检出	7.1
E	191201	未检出	10.6
F	68200101	未检出	6.7
	68200901	未检出	6.3
	68200901	未检出	6.3
G	S10039E	未检出	6.8
	R14319T	未检出	6.4

溶液色谱图中各色谱峰间的分离度应符合要求，以满足试验要求。

3.2 色谱柱的选择

本研究以“**2.2**”项下的系统适用性溶液为考察对象，分别考察了 Dionex IonPac™ AS_{22} 阴离子柱（4 mm×25 cm，5 μm）、Dionex IonPac™ AS_{14} 阴离子柱（4 mm×25 cm，5 μm）与 Dionex IonPac™ AS_{23} 阴离子柱（4.0 mm×25 cm，5 μm）3 种型号色谱柱的分离效果。结果显示，在 Dionex IonPac™ AS_{22} 阴离子柱测得的系统适用性溶液色谱图中，**3** 根离子峰与甲酸根离子峰间的分离度仅为 1.1；在 Dionex IonPac™ AS_{14} 阴离子柱测得的系统适用性溶液色谱图中，**3** 根离子峰与甲酸根离子峰以及 **2** 根离子峰与磷酸根离子峰同时出峰，不能分离；在 Dionex IonPac™ AS_{23} 阴离子柱测得的系统适用性溶液色谱图中，各峰间的分离度均大于 1.5，故色谱柱最终选择 Dionex IonPac™ AS_{23} 阴离子柱（4.0 mm×25 cm，5 μm）。

3.3 淋洗液的选择

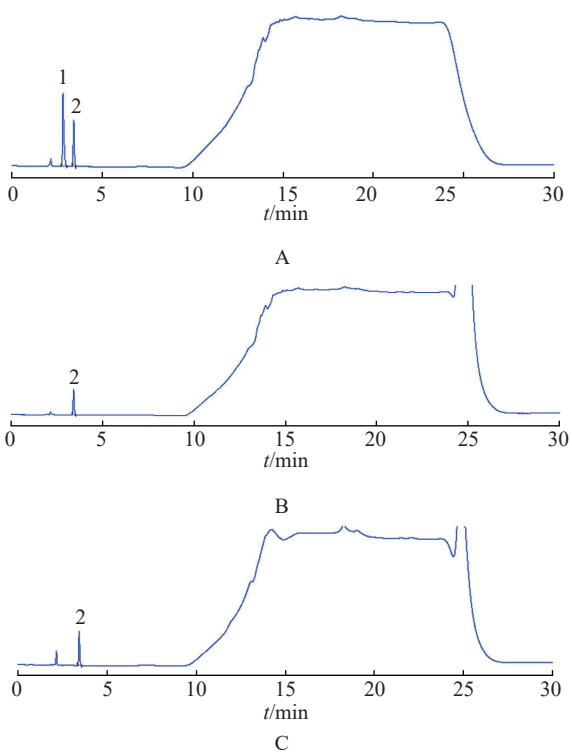
根据“**3.2**”项下的考察结果，采用 Dionex IonPac™ AS_{23} 阴离子柱（4.0 mm×25 cm，5 μm），以“**2.2**”项下的系统适用性溶液为考察对象，分别考察了 1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -3.0 mmol/L 碳酸钠溶液、1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -3.5 mmol/L 碳酸钠溶液、1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液、1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -5.0 mmol/L 碳酸钠溶液、1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -6.0 mmol/L 碳酸钠溶液、0.5 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液、0.75 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液、1.25 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液、1.5 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液 9 种淋洗液体系的分离效果。结果表明，采用 1.0 mmol/L 碳酸氢钠溶液 -4.0 mmol/L 碳酸钠溶液为淋洗液，能够保证各色谱峰间的分离效果均较佳，同时分析时间较短。

3.4 流速的选择

在上述试验的基础上，以“**2.2**”项下的系统适用性溶液为考察对象，分别考察了 4 种不同的流速（0.5、0.7、1.0、1.2 mL/min）对检测结果的影响。结果表明，流速越大，所得系统适用性溶液色谱图中各色谱峰间的分离度越好、分析时间越短，但柱压也较高。因此，为兼顾分离度、分析时间与柱压，最终确定流速为 1.0 mL/min。

3.5 《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）四部通则 0872 合成多肽中的 **3** 测定法考察

在本方法的摸索过程中，对 ChP 2020 四部通则 0872 合成多肽中的 **3** 测定法进行了考察。结果表明，**2** 和 **3** 的定量限分别为 53.05、25.06 ng，检测限分别为 26.53、12.53 ng，5 个厂家 11 批 **1** 原料药与 5 个厂家 12 批 **1** 注射液中 **3** 的测定结果分别为 5.6%～ 7.8%与 5.8%～ 10.5%，**2** 均未检出。混合对照品溶液、原料药供试品溶液与制剂供试品溶液的典型高效液相色谱图如图 2 所示。结果表明，2 种方法的样品测定结果基本一致，但与本研究建立的离子色谱法的灵敏度（**2** 和 **3** 的定量限分别为 1.4、5.1 ng，检测限分别为 0.7、2.5 ng）相比，高效液相色谱法的灵敏度较低（**2** 和 **3** 的定量限分别为 53.05、25.06 ng，检测限分别为 26.53、12.53 ng），对于 **2** 含量较低（限度≤ 0.01%）的样品，高效液相色谱法的灵敏度可能不满足 **2** 的检测要求，且由图 2 可知，**2** 和 **3** 在 C_{18} 色谱柱上的保留较弱、出峰较快，峰形较差，溶剂峰易干扰 **2** 的检测结果，且 **3** 出峰后还需耗费较长的时间用高比例有机相洗脱多肽，分析时间较长。



A—混合对照品溶液；B—原料药供试品溶液；
C—制剂供试品溶液。
1—**2**；2—**3**。

图 2　高效液相色谱法的典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms of HPLC Method

本研究建立的离子色谱法可同时测定 **1** 原料药及其注射液中的 **2** 和 **3**，且环保、简便、准确度高，与 ChP 2020 已收录的多肽药物中 **3** 的检测方法相比，灵敏度较高、通用性较强、样品配制简单，减少了有机溶剂使用，并且简化了色谱柱净化过程，可作为测定 **1** 中 **2** 和 **3** 的国家标准，扩展先进检测技术在国家标准中的应用，完善肽类药物的国家药品标准体系，实现对 **1** 原料药和 **1** 注射液的质量控制。

参考文献：

[1]　黄诗华, 张映辉, 谭伟涛. 醋酸阿托西班对高龄晚期先兆早产孕妇血清性激素与妊娠结局的影响[J]. 中国临床研究, 2019, **32**(4): 542-544.

[2]　王亚凡, 刘晓旭, 梁建梅, 等. 醋酸阿托西班治疗晚期流产及早产的疗效观察[J]. 国际妇产科学杂志, 2016, **43**(1): 49-50.

[3]　霍　莹. 醋酸阿托西班与硫酸镁治疗早产胎膜早破的临床效果[J]. 中国保健营养, 2021, **31**(18): 179.

[4]　钟祥龙, 张　强, 赵　越, 等. 醋酸阿托西班制备工艺的研究[J]. 中国当代医药, 2014, **21**(20): 17-21.

[5]　陈丽娟, 李伟华, 蔡爱华, 等. 离子色谱法测定血液透析浓缩物中醋酸根离子的方法学研究[J]. 中国食品药品监管, 2020, (6): 70-74.

[6]　周长朋, 王东武, 郑文凤, 等. 离子色谱/直接电导法测定利格列汀药物中三氟乙酸残留[J]. 分析测试学报, 2015, **34**(12): 1425-1429.

[7]　李婧华, 刘桂霞, 李盼盼, 等. 离子抑制色谱法测定注射用醋酸奥曲肽中乙酸的含量[J]. 中国药房, 2016, **27**(27): 3867-3869.

[8]　陈　静, 张立雯, 董顺玲, 等. 高效液相色谱法测定五水头孢唑林钠原料药中醋酸的含量[J]. 中国抗生素杂志, 2017, **42**(10): 920-922.

[9]　梁中卫, 戴　杰, 孔凯丽, 等. 使用新型混合模式色谱柱HPLC法测定赖诺普利原料药中的三氟乙酸[J]. 山东化工, 2021, **50**(24): 125-127.

[10]　刘智慧, 周　庚, 郑佳彤, 等. HPLC法测定双羟萘酸曲普瑞林中残留的三氟乙酸[J]. 今日药学, 2020, **30**(1): 23-26.

[11]　梅　芊, 刘　英. HPLC法测定醋酸奥曲肽注射剂中醋酸的含量[J]. 中国药品标准, 2017, **18**(4): 271-274.

[12]　周　晖, 王东凯. 气相色谱法对自制生长抑素中醋酸含量的测定[J]. 中国医科大学学报, 2004, (3): 91-92.

[13]　ELSASHIT A A, ELGORASHE R E E, ALNAJJAR A O, *et al*. Capillary electrophoresis method for simultaneous analysis of caffeine, vanillin and ethyl vanillin in beverages [J]. *Sep Sci Plus*, 2021, **4**(6/7): 266-272.

[14]　闻宏亮, 赵敬丹, 秦　峰, 等. 离子色谱法测定注射用氯唑西林钠中醋酸根离子含量[J]. 药物分析杂志, 2016, **36**(7): 1268-1273.