

子杂质与主成分未完全分离,故接收液中含有部分头孢羟氨苄。

3.5 本品在水中微溶,因此制备样品溶液时,如使用超声助溶,应注意时间不宜过长,否则溶液变热后会产生高分子杂质,从而使测定结果偏高。

3.6 在高分子杂质线性关系实验中,7个测定质量浓度中的主成分峰与杂质峰的分离度均符合要求。

3.7 根据稳定性实验结果,对照溶液和供试品溶液均不稳定,因此应溶解后立即进样分析。

REFERENCES

[1] HU C Q, JIN S H. Quantitative determination of high molecular weight impurities of β -lactam antibiotics by external standard method of reference oneself[J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 1997, 22(1): 23-27
[2] YUAN W W. High-molecular polymers content in β -lactam antibiotics and their revision of procedures described in the Chinese Pharmacopoeia 2005[J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志),

2005, 30(12): 727-730.
[3] Ch. P(2010) Vol II (中国药典 2010年版. 二部) [S]. 2010 178-179, 210-212
[4] ZANG H M. Development and validation for determination of high molecular polymers concentration in cefadroxil[J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2010 35(6): 450-452
[5] GU L S, HU C Q, JIN S H. Studies on the separation and quality control of high molecular weight impurities in augmentin[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001 21(1): 13-15.
[6] WANG C G, CAO Y, ZHANG J *et al*. HPSEC Determination of the polymers in cefotaxime sodium[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009 29(5): 814-818
[7] NI J W, WEI R Q, LIU X N, *et al*. Isolation of polymer impurities in piperacillin sodium by polystyrene-based gel filtration chromatography[J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2010 36(2): 135-138
[8] HU C Q, JIN S H, SUN X L. Studies on relationship between structure of cephalosporins and its polymerization I Relationship between structure of cephalosporins and type of its polymerization [J]. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 1991 16(1): 25-29
(收稿日期: 2011-03-07)

HPLC测定二巯丁二酸的有关物质

乐健¹,王麟达¹,陈桂良¹,洪战英^{2*} (1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203 2. 中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要:目的 建立二巯丁二酸中有关物质的 HPLC测定方法。方法 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μ m); 流动相 A: 硫酸氢四 基铵磷酸盐溶液 (含硫酸氢四 基铵 3.2 g·L⁻¹、磷酸二氢钠 6.5 g·L⁻¹和乙二胺四乙酸二钠 0.09 g·L⁻¹)-甲醇 (85:15), 流动相 B 甲醇; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 220 nm; 线性梯度洗脱: 0 min, 100% A; 10 min, 100% A; 20 min, 80% A; 50 min, 80% A。结果 二巯丁二酸与 巯二酸、各杂质峰之间分离良好。二巯丁二酸在 14.0~112.0 μ g·mL⁻¹内线性良好, $r=0.9993$ 检测限为 1.8 μ g·mL⁻¹; 巯二酸在 10.3~82.3 μ g·mL⁻¹内线性良好, $r=1.0000$ 检测限为 0.4 μ g·mL⁻¹, 巯二钠的平均加样回收率为 98.3%。结论 本方法专属性强、准确度高, 适合测定二巯丁二酸的有关物质。

关键词: 二巯丁二酸; 巯二酸; 高效液相色谱法; 有关物质; 梯度洗脱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)13-1030-04

Determination of Related Substances in Dimercaptosuccinic Acid by HPLC

LE Jian¹, WANG Lin-da¹, CHEN Guiliang¹, HONG Zhan-ying^{2*} (1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203; *Chin J Pharm*; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of related substances in dimercaptosuccinic acid. METHODS An Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μ m) column was applied. Mobile phase A was tetrabutylammonium bisulfate phosphate solution containing tetrabutylammonium bisulfate 3.2 g·L⁻¹, potassium dihydrogen phosphate 6.5 g·L⁻¹ and disodium

作者简介: 乐健, 男, 副主任药师 研究方向: 药物质量控制 * 通讯作者: 洪战英, 女, 副教授 研究方向: 药物分析 Tel: (021) 81871261-85 E-mail: hongzhy001@yahoo.com.cn

um edenate 0.09 g• L⁻¹, mobile phase B was methanol Gradient elution program: 0 min 100% A; 10 min 100% A; 20 min 80% A; 50 min 80% A. The flow rate was 1.0 mL• min⁻¹. Detection wavelength was set at 220 nm. **RESULTS** The linear range of dimercaptosuccinic acid was 14.0–112.0 μg• mL⁻¹ (*r* = 0.9993), limit of detection was 1.8 μg• mL⁻¹. The linear range of acetylenedicarboxylic acid was 10.3–82.3 μg• mL⁻¹ (*r* = 1.0000), limit of detection was 0.4 μg• mL⁻¹, while the average recovery was 98.3%. **CONCLUSION** This method proved to be specific accurate and suitable for determining the related substances in dimercaptosuccinic acid.

KEY WORDS dimercaptosuccinic acid; acetylenedicarboxylic acid; HPLC; related substances; gradient elution

二巯丁二酸 (dimercaptosuccinic acid, DMSA) 为金属、类金属解毒药, 用于治疗锑、汞、砷、铅、铜等急、慢性中毒及肝豆状核变性 (铜代谢障碍)。解毒机制为分子内活泼的双巯基或巯基和羧基与金属离子生成稳定的五元环络合物后经肾脏由尿排出, 从而竞争性地解除金属毒物对机体内巯基酶的抑制^[1-2]。DMSA 最初由 Owen 于 1949 年合成^[3], 但未用于临床。中科院上海药物所于 1957 年合成并发现其解毒作用^[4], 20 世纪 80 年代在我国上市。美国 FDA 于 1991 年批准其作为治疗儿童铅中毒的药物。现除《中国药典》2010 年版外, USP (31 版)、BP (2008 年) 以及 JP (15 改正版) 均未收载该品种。由于本品用于临床时间较早, 现行标准对有关物质等未加以控制^[5], 但本品在临床应用时很不稳定, 例如其钠盐水溶液不能用作静脉滴注, 一般采用静脉注射 (10~15 min 注射完毕) 或肌肉注射, 可能就是由于久置降解所致, 建立一个有关物质测定方法有其必要性。DMSA 的合成以糠醛为起始原料, 氧化得反式丁烯二酸, 再经溴加成得二溴代丁二酸, 氢氧化钠碱液消除得丁炔二钠, 进而与硫代乙酸在酸中加成水解, 即得。因此, 本品中可能还存在反应中间体丁炔二酸 (acetylenedicarboxylic acid, ACA)。本实验建立的高效液相色谱法可同时测定 DMSA 中已知杂质 ACA 和未知杂质, 方法专属、准确, 也可以用于其制剂和钠盐的有关物质测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (二极管阵列检测器); Sartorius CP 225D 电子天平; DMSA (批号: 070825 和 070826) 和丁炔二钠 (上海新亚药业有限公司)。甲醇和硫酸氢四丁基铵均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm,

5 μm); 流动相 A 为硫酸氢四丁基铵磷酸盐溶液 [含硫酸氢四丁基铵 3.2 g• L⁻¹、磷酸二氢钠 6.5 g• L⁻¹ 和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 0.09 g• L⁻¹]-甲醇 (85:15), 流动相 B 为甲醇; 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL• min⁻¹; 检测波长为 220 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 30 °C, 见表 1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 溶剂 质量浓度为 27.5 g• L⁻¹ 的磷酸氢二钠溶液与甲醇 1:1 等体积混合。

2.2.2 供试品溶液 精密称取 DMSA 适量, 加溶剂溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 DMSA 4 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取丁炔二钠 22.8 mg 置 20 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释刻度。精密量取 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加供试品溶液 1 mL, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.4 系统适用性实验溶液 取浓度为 1.14 mg• mL⁻¹ 的丁炔二钠溶液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加供试品溶液稀释至刻度, 作为系统适用性实验溶液。

2.3 系统适用性实验

精密量取系统适用性实验溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, DMSA 峰与 ACA 峰的分度为 5.2 相对保留时间约为 3.4 处的二杂质峰的分度为 1.8 见图 1。

2.4 专属性

称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 1 mol• L⁻¹ 的盐酸溶液 1 mL, 摇匀, 放置 7 h, 加 1 mol• L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 1 mL, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作

表 1 梯度洗脱表

Tab. 1 Gradient elution program

<i>t</i> /min	Mobile phase A	Mobile phase B
0	100	0
10	100	0
20	80	20
50	80	20

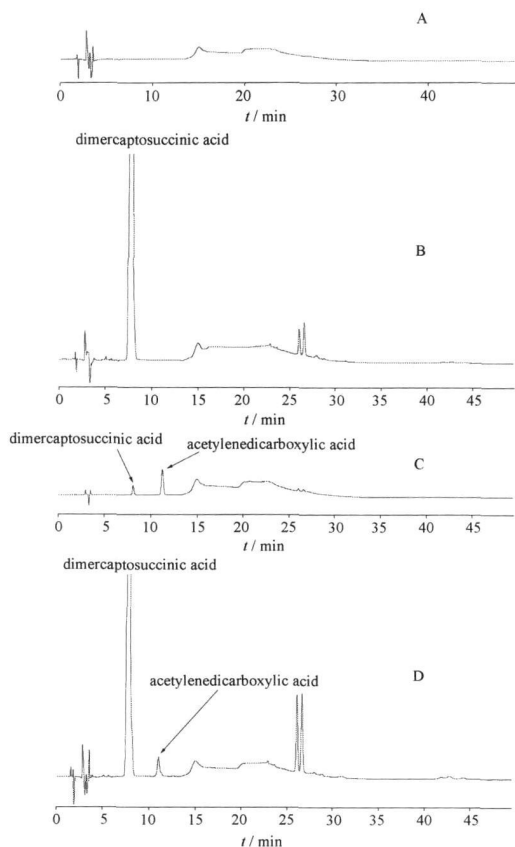


图 1 DMSA 高效液相色谱图

A - 溶剂; B - 供试品溶液; C - 对照品溶液; D - 系统适用性实验溶液

Fig 1 Chromatograms of dimercaptosuccinic acid (DMSA)

A - solvent B - testing solution; C - reference standard solution D - system suitability test solution

为酸破坏溶液; 称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 h, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 1 mL, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为碱破坏溶液; 称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 3% 过氧化氢溶液 1 mL, 放置 6 h, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为氧化破坏溶液; 取 DMSA 适量, 在 60°C 放置 10 d 后, 称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为高温破坏溶液; 取 DMSA 适量, 在相对湿度为 75% 的条件下放置 10 d 后, 称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为高湿破坏溶液; 取 DMSA 适量, 在照度为 4 000 k 条件下光照 10 d 后, 称取 DMSA 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为光破坏溶液。分别量取酸、碱、氧化、高温、高湿和光破坏溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按表 1 的方法梯度分析, 实验结果表明: 在碱、氧化破坏条件下, 杂质峰数目和面积较显著增加; 所有杂质峰均能与 DMSA 峰和

ACA 峰完全分离, 主峰纯度大于 99% 表明本方法专属性良好。

2.5 线性关系

分别精密量取质量浓度为 $5.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DMSA 溶液 1 mL 和质量浓度为 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丁炔二钠溶液 (以 ACA 计为 $0.823 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 精密量取适量, 加流动相逐级稀释成一系列浓度的标准曲线用对照品溶液, 分别精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以 DMSA 的峰面积 A 对相应的质量浓度 ρ 进行回归分析, DMSA 在 $14.0 \sim 112.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 回归方程为: $A = 1.608\rho + 1.558$, $r = 0.9993$ 以 ACA 的峰面积 A 对相应的浓度 ρ 进行回归分析, ACA 在 $10.3 \sim 82.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内, 回归方程为: $A = 8.992\rho - 1.558$, $r = 1.0000$ 。

2.6 检测限

将线性方程中浓度最低的对照品溶液逐级稀释, 分别精密量取 10 μL 注入高效液相色谱仪进行测定, 以 DMSA 峰的信噪比为 3 计算其最低检测浓度为 $1.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 ACA 峰的信噪比为 3 计算其最低检测质量浓度为 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度

精密量取对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 按“2.1”色谱条件测定峰面积, DMSA 和 ACA 峰面积的 RSD 分别为 1.8% 和 0.2% ($n = 6$)。

2.8 溶液的稳定性

将新配制的供试品溶液在室温下放置, 并间隔一定时间分别进样 10 μL , DMSA 峰面积逐渐减小, 杂质峰面积逐渐增加, 放置 3 h 后, 最大杂质和总杂质峰面积均为最初配制时的 2 倍左右。因此, 供试品溶液在制备后应尽快进样。

2.9 加样回收率

取 DMSA 约 40 mg 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加浓度为 $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丁炔二钠溶液 0.25、0.5 和 1.0 mL, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 精密量取 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 计算得到丁炔二钠的平均加样回收率为 98.3%, RSD 为 2.3% ($n = 6$)。

2.10 耐用性

保持色谱其他条件不变, 分别用 Diamon-sil C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱和 Agela Venusil MP- C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 色谱柱测定供试品, 最大杂质和总杂质结果基本一致, 只是 Agela Venusil MP- C_{18} 色谱柱中 DMSA 峰的对称性要

差些,这可能与该款产品填料更适合 100% 水相流动相的特点有关。

本实验流动相中水相的 pH 值为 4.6 分别调节 pH 值至 3.6 或 5.6 其他色谱条件不变,测定供试品,最大杂质和总杂质结果基本一致,DM SA 峰的保留时间不变,主峰前紧邻杂质峰与主峰分离度随 pH 值增加而增加,但与溶剂峰分离度减小,故以 pH 4.6 较为适中。

2.11 有关物质的测定

精密量取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪,按表 1 的方法进行梯度分析,以外标法计算 ACA 的含量,以主成分自身对照法计算其他杂质的含量,批号为 070825 和 070826 的 DMSA 中,总杂质分别为 9.3% 和 8.6%,最大单个杂质分别为 4.8% 和 4.1%,ACA 均未检出。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

用二极管阵列检测器对 DMSA、ACA 和主要杂质进行光谱扫描分析,发现均只有末端吸收。无论是已知杂质还是未知杂质,性噪比均以 220nm 为最高,因此选用 220 nm 作为检测波长。

3.2 流动相和洗脱方式的选择

流动相中,硫酸氢四丁基铵为离子对试剂,一定的磷酸盐浓度可以保证系统的稳定性,并且提高杂质峰的检出个数,EDTA 可以减少色谱系统中金属离子的干扰。如果以流动相 A 进行等度洗脱,主峰保留时间约为 8 min,出峰时间合适,但保留时间 105 min 处(对主峰的相对保留时间为 13.5 倍)仍有杂质峰被洗脱,而按表 1 方法进行梯度洗脱时,主峰保留时间未变,45 min 后基本无杂质峰,分析时间缩短,杂质峰的信噪比更高,明显优于等比例洗脱。

3.3 溶剂的选择

DMSA 为有机酸,在甲醇或乙醇中微溶,在水和酸中不溶,可溶于氢氧化钠溶液、碳酸氢钠溶液等碱性溶液生成二疏丁二钠。经实验,DM SA 在甲醇中溶解度不高,溶解速率慢,且易发生色谱峰变形,但供试品溶液稳定性好;而 DM SA 的氢氧化钠溶液极易变色,碳酸氢钠溶液由于会与流动相生成二氧化碳,在色谱图上表现为保留时间不定的宽峰干扰,因此均不适合用作溶剂。最终选定的溶剂中,磷酸氢

二钠溶液 pH 值为 9.4 显碱性,与 DM SA 的反应产物磷酸二氢钠与流动相的成分相同;溶剂中磷酸盐浓度为 0.04 mol $\cdot$ L⁻¹,与流动相一致。溶剂中的甲醇可以增加供试品溶液的稳定性,并且使溶剂组成尽可能接近流动相。总之,该溶剂较好地兼顾了样品的溶解性和方法的稳定性。

3.4 金属离子和 EDTA 的影响

DM SA 为金属螯合剂,其自身或结构类似的降解物均可能与潜在的金属离子进行络合反应。以铜离子为例,当供试品溶液中含 3 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的铜离子(约相当于主成分的千分之一)时,主峰面积随放置时间延长逐渐变小,但各杂质表现不一,峰面积有增加或减小。峰面积增加的杂质应为主成分的降解物,但未与铜离子反应;减少的原因可能是由于杂质与主成分有类似的结构,金属参与或加速了降解反应。金属离子对杂质峰的不同影响情况可为今后杂质的结构鉴定工作提供参考。曾尝试在供试品溶液中加入浓度与主成分相当的 EDTA,同时加铜离子,结果并不能阻止 DM SA 峰面积减小,说明 EDTA 不能竞争破坏 DM SA 与金属离子的络合反应,并且 EDTA 峰还可能干扰主峰前的杂质峰检测,所以在溶剂中未加 EDTA。

本实验测定的样品,从生产至今已有两年半,总杂质和单个最大杂质结果均很高可能与此有关。由于 DM SA 的产量小、生产不能常态化,我们暂无法收集近期的产品。本实验的研究结果说明,确实有必要在生产、流通领域有效地监控 DM SA 的有关物质,确保药品的质量。

REFERENCES

- [1] APOSHIAN H V, APOSHIAN M M. Mes-2, 3-dimercaptosuccinic acid: chemical, pharmacological and toxicological properties of an orally effective metal chelating agent [J]. *Amu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, 30: 279-306.
- [2] LIU S J, JU X H, SUN K M. A cute toxicity of mes-2, 3-dimercaptosuccinic acid on mice [J]. *Chin J Prim Med Pharm* (中国基层医药), 2007, 14(8): 1315-1317.
- [3] OWEN L N, SULTAN BAW A M U S. Olefinic acids: part V II the addition of thiols to propiolic and acetylenedicarboxylic acid [J]. *J Chem Soc*, 1949, 43: 3109-3113.
- [4] LIANG Y Y, SHI J M, CHEN L X, *et al*. Dimercaptosuccinic acid promoted the excretions of Pb, Cu, Sb, Sr, Tl and Bn [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1980, 15(6): 335-340.
- [5] *Ch. P* (2010) Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 19.

(收稿日期: 2010-11-30)