

### 【基础研究】

**作者简介:**朱永琴(1972-),女,河南郑州人,硕士,副主任药师,主要从事药物质量分析及控制研究。

护心肌,临床应用具有使用安全、疗效确切等特性<sup>[6-7]</sup>。根据磷酸肌酸钠合成工艺及所用起始原料的生产工艺,磷酸肌酸钠合成中可能涉及潜在 GTI 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯。目前,对 GTI 检测方法较多<sup>[8-12]</sup>,但对磷酸肌酸钠中潜在 GTI 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯检测未见报道。本文利用超高效液相色谱-串联质谱法,建立了磷酸肌酸钠中磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯测定含量方法,为磷酸肌酸钠生产工艺过程控制和质量保障提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 甲醇、甲酸为色谱纯,购自美国默克化工技术(上海)有限公司,水为纯化水,磷酸肌酸钠由开封明仁药业有限公司提供(批号:20170301、20170302、20170303),磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯对照品由开封明仁药业有限公司合成并精制(批号:20180201、20180201、20180203); Waters XEVO TQ-S 超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪购自沃特世科技(上海)有限公司,METTLER TOLEDO XP20S 电子分析天平购自梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

1.2.1.1 混合对照品储备液制备 取磷酸肌酸钠、磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯和肌酐磷酸二乙酯对照品适量,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 0.1 mL,分别置于 20 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液,终浓度为 1 000 μg · L<sup>-1</sup>。

1.2.1.2 供试品溶液制备 取磷酸肌酸钠样品 1 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加水适量,超声提取

表 1 磷酸肌酸钠及 3 种杂质的超高效液相色谱-质谱法参数

| 化学成分    | 分子式  | 母离子(m/z) | 定量离子(m/z) | 定性离子(m/z) |
|---------|--|----------|-----------|-----------|
| 磷酸肌酸    | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P | 212.03   | 90.02     | 114.09    |
| 磷酸三乙酯   | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P                | 183.09   | 155.05    | 127.01    |
| 肌酸磷酸二乙酯 | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> P | 269.03   | 194.97    | 152.88    |
| 肌酐磷酸二乙酯 | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P | 250.07   | 114.03    | 194.04    |

2.2 标准曲线、检出限与定量限试验 结果见表 2。磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯的线性回归方程呈良好线性关系,相关系数均 >

表 2 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸的标准曲线、相关系数、检出限及定量限

Tab.2 Calibration curves,correlation coefficients,limits of detection and limits of quantification of triethyl phosphate,diethyl creatine phosphate,creatinine phosphate

| 化学成分    | 标准曲线                       | r       | 范围/(μg · L <sup>-1</sup> ) | 检出限/(μg · kg <sup>-1</sup> ) | 定量限/(μg · kg <sup>-1</sup> ) |
|---------|----------------------------|---------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 磷酸三乙酯   | y = 22 984 647x + 8 575.22 | 0.999 9 | 0.5 ~ 135.6                | 0.2                          | 0.6                          |
| 肌酸磷酸二乙酯 | y = 465 825x + 13 911.26   | 0.998 0 | 4.1 ~ 103.9                | 1.3                          | 4.1                          |
| 肌酐磷酸二乙酯 | y = 8 626 426x - 2 602.96  | 0.999 8 | 0.8 ~ 125.6                | 0.3                          | 0.9                          |

取 20 min,放冷,加水至刻度,摇匀。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm × 10 cm;1.7 μm),柱温 30 ℃,流动相:0.1% 甲酸水溶液-甲醇(60 : 40),流速:0.25 mL · min<sup>-1</sup>; 进样体积:20 μL。

1.2.3 质谱条件 电喷雾电离源,毛细管电压:3.0 kV; 离子源温度:150 ℃; 氦气流量:0.15 mL · min<sup>-1</sup>;脱溶剂气温度:450 ℃;脱溶剂气流量:1 000 L · h<sup>-1</sup>;锥孔气流量:150 L · h<sup>-1</sup>。采用正离子模式,多反应监测测定。

1.2.4 标准曲线制备、检出限和定量限 分别精密量取杂质磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯和肌酐磷酸二乙酯对照品贮备液适量,加甲醇稀释配制系列标准曲线溶液,以定量限浓度为最低浓度点,按上述色谱条件测定,记录色谱图,以杂质的浓度和峰面积进行回归。

按“1.2.2 和 1.2.3”项下确定的实验条件在空白样品中加标后测定,以信噪比约为 3 时对应的各标准溶液浓度为检出限;以信噪比约为 10 时对应的各标准溶液浓度为定量限。

1.2.5 加标回收率和精密度试验 以不含 3 种杂质的磷酸肌酸钠为本底,分别添加高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液,浓度分别为 1 × 各杂质定量限、50 μg · L<sup>-1</sup>和 100 μg · L<sup>-1</sup>,进行回收率试验,每个浓度水平平行测定 6 次,计算平均回收率和相对标准偏差,以评价该方法的回收率和精密度。

1.2.6 样品检测 取 3 批磷酸肌酸钠原料药,按“1.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定。

2 结果

2.1 质谱条件 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯检测的质谱条件见表 1。

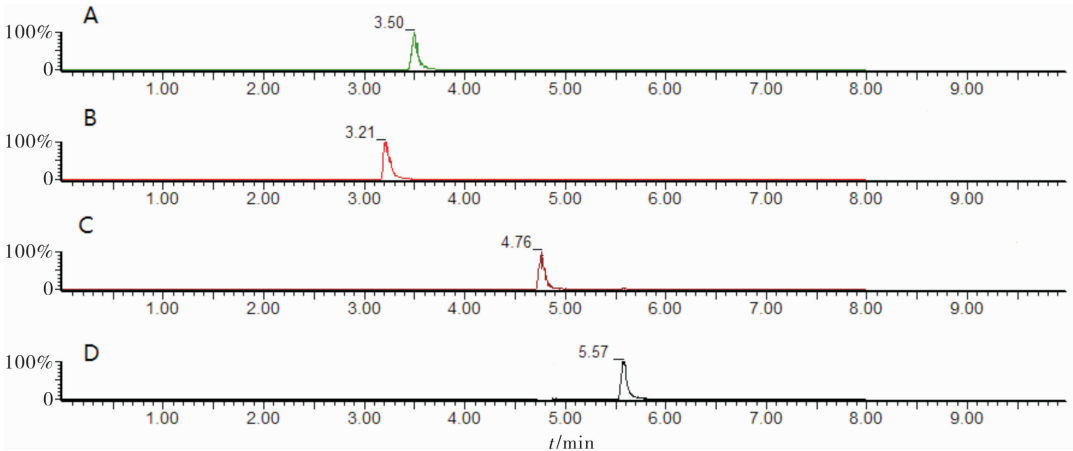
0.998;检测限分别为 0.2、1.3、0.3 μg · kg<sup>-1</sup>;定量限分别为 0.6、4.1、0.9 μg · kg<sup>-1</sup>。

**2.3 加标回收率和精密度试验** 结果见表3。3种 偏差为0.3%~2.8%。  
杂质的加标回收率为97.4%~103.8%,相对标准

**表3 磷酸肌酸钠中3种杂质的加标回收率及其相对标准偏差**  
**Tab.3 Recoveries and relative standard deviations of three impurities in creatine phosphate sodium** (n=3)

| 化学成分    | 低浓度     |          | 中浓度     |          | 高浓度     |          |
|---------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|
|         | 加标回收率/% | 相对标准偏差/% | 加标回收率/% | 相对标准偏差/% | 加标回收率/% | 相对标准偏差/% |
| 磷酸三乙酯   | 103.8   | 1.3      | 101.1   | 0.6      | 100.2   | 0.3      |
| 肌酸磷酸二乙酯 | 97.4    | 2.8      | 100.8   | 1.0      | 101.6   | 0.7      |
| 肌酐磷酸二乙酯 | 100.2   | 0.5      | 99.5    | 1.6      | 99.8    | 0.5      |

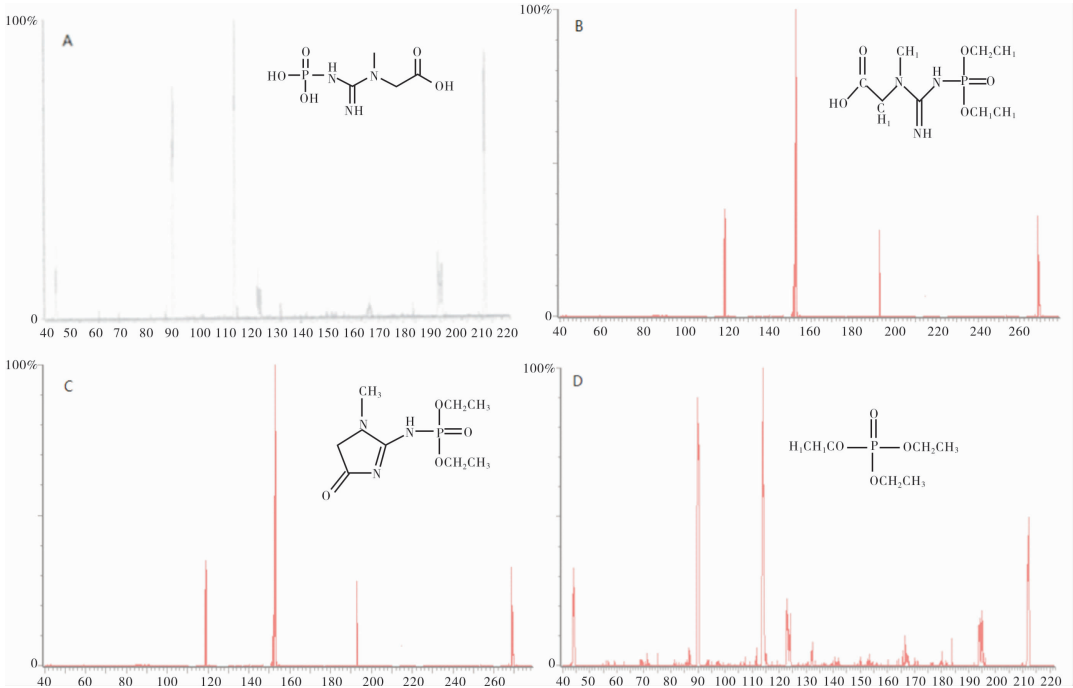
**2.4 样品检测结果** 3批样品均未检出磷酸三乙 合标准溶液的总离子流图及质谱图见图1和图2。  
酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯。3种杂质混



A:肌酸磷酸二乙酯;B:磷酸肌酸;C:肌酐磷酸二乙酯;D:磷酸三乙酯。

**图1 磷酸肌酸钠及3种杂质混合标准溶液的总离子流色谱图**

**Fig.1 Total ion current chromatograms of a mixture of creatine phosphate sodium and three impurities**



A:磷酸肌酸;B:肌酸磷酸二乙酯;C:肌酐磷酸二乙酯;D:磷酸三乙酯。

**图2 磷酸肌酸钠及3种杂质的质谱图**

**Fig.2 Mass spectrogram chromatograms of creatine phosphate sodium and three impurities**

### 3 讨论

目前,磷酸肌酸钠的生产方法主要有酶催化法和化学合成法。酶催化法<sup>[14]</sup>中肌酸激酶不易得,大生产中工艺稳定性差,成本高,且分离纯化用离子交换树脂,操作繁琐。化学合成是目前工业化生产主流方法,磷酸肌酸钠化学工艺有多种方法<sup>[15-16]</sup>,其中练美华<sup>[16]</sup>采用肌酐经三氯氧磷磷酰化制得二氯代磷酸肌酐,用碳酸氢钠部分水解得到磷酸肌酐钠,再经过氢氧化钠水解开环得到磷酸肌酸钠粗品,乙醇精制得到目标产物。在这条合成路线中,三氯氧磷作为起始原料,自身化学性质十分活泼,遇水剧烈反应,生成磷酸,进一步跟乙醇酯化生成磷酸三乙酯;中间体磷酸肌酐跟乙醇酯化反应,生成肌酐磷酸二乙酯;磷酸肌酸同样和乙醇酯化反应,生成肌酸磷酸二乙酯。因此,在实际生产中有生成磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯杂质的风险,目前没有明确方法对磷酸肌酸钠中该类杂质进行控制,能够灵敏检测出磷酸肌酸钠产品中是否存在该类杂质,有利于产品质量控制,保障药品安全。

本研究使用 Waters XEVO TQ-S 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪检测磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯、肌酐磷酸二乙酯杂质。采用电喷雾离子源,利用自身软件的自动调谐功能,在已知目标结构的情况下,通过直接进样能够自动调谐优化出目标结构的特征离子对,大大提高了工作效率。

流动相成分及比例变化能够影响液相的分离效果和质谱离子化效率。流动相中加入酸后能够在质谱离子源处提供更多质子,有利于样品更好离子化,从而使响应值增大。同时,样品处在酸性环境中,有利于保持目标成分结构稳定,峰形得到明显改善。甲酸良好的挥发性能减少对质谱的污染,所以选择 0.1% 甲酸水溶液作为水相。前期研究分别比较了乙腈和甲醇作为有机相的分离效果。结果表明,采用 0.1% 甲酸-甲醇(60:40)作为流动相,分离效果好,质谱响应高。

综上所述,本方法能够对磷酸肌酸钠中的潜在 GTI 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯和肌酐磷酸二乙酯进行有效监控,专属性强,灵敏度高,满足 GTI 测

定的特殊要求,可作为磷酸肌酸钠中的潜在 GTI 磷酸三乙酯、肌酸磷酸二乙酯和肌酐磷酸二乙酯的质控方法。

### 参考文献:

- [1] 王萍,徐彩虹,陈仙,等. 原料药中基因毒性杂质控制的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2015,32(1):119-126.
- [2] EMEA. Guideline on the limits of genotoxic impurities. committee for medicinal products for human use[S]. Committee for Medicinal Products for Human Use(CHMP),2006.
- [3] EMEA. Questions and answers on the guideline on the limits of genotoxic impurities [S]. Committee for Medicinal Products for Human Use(CHMP),2010.
- [4] FDA. Guidance for industry genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products;recommended approaches (Draft Guideline) [S]. Food and Drug Administration(FDA),2008.
- [5] SINGH J. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use[J]. *J Pharmacol Pharmacother*. 2015,6(3):185-187.
- [6] 黄萍. 浅析心血管疾病中使用磷酸肌酸钠的临床效果[J]. 当代医学,2016,22(12):128-129.
- [7] 曹甦,姚惠辉,牛锋. 磷酸肌酸钠治疗儿童病毒性心肌炎疗效观察[J]. 新乡医学院学报,2019,36(7):670-672.
- [8] 王萍,徐彩虹,陈仙,等. 原料药中基因毒性杂质控制的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2015,32(1):119-126.
- [9] 李海霞,白培锋,刘娜,等. 卡非佐米中基因毒性杂质和吗啡乙酸的 LC-MS/MS 法测定[J]. 中国医药工业杂志,2016,47(10):1308-1310.
- [10] 阮晓玲,郑项元,徐洁,等. 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2016,47(3):267-274.
- [11] 刘雪薇,历程,韩海云,等. 药物中磺酰胺类基因毒性杂质研究进展[J]. 色谱,2018,36(10):952-961.
- [12] 叶晓霞,吴静雯,乐健,等. 富马酸替诺福韦二吡啶酯中基因毒性杂质溴乙烷的 GC-MS/MS 法测定[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(12):1701-1704.
- [13] 陈爽,黄巧巧. 左氧氟沙星中潜在基因毒性杂质二氯亚砷的 GC-MS 法测定[J]. 海峡药学,2019,31(5):54-56.
- [14] 杨志雄,周小华,赵春花,等. 固定化肌酸激酶柱连续合成磷酸肌酸工艺[J]. 药物生物技术,2015(3):213-217.
- [15] 陈宁. 磷酸肌酸钠的合成[J]. 广州化工,2016,44(23):48-50.
- [16] 练美华. 磷酸肌酸钠的合成[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(7):655-657.

(本文编辑:杨 博)