

# HPLC法检查氟尿嘧啶注射液有关物质

肖英, 黄萍, 石峰 (山东省药品检验所, 济南 250101)

**摘要 目的:** 建立氟尿嘧啶注射液有关物质检查方法。**方法:** 确定 HPLC 法并进行方法验证。**结果:** 以普通十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱, 以甲醇-水 (用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸溶液调节 pH 值至 3.5) (5:95) 为流动相, 检测波长为 265 nm。结果表明, 氟尿嘧啶与降解产物分离良好。氟尿嘧啶浓度在  $0.25 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系, 供试液稳定, 检测结果受流动相两相比例、水相 pH 值、柱温、色谱柱品牌变化波动的影响较小。**结论:** 本法检测灵敏、专属性强、重复性好、普适耐用。

**关键词:** 高效液相色谱法; 氟尿嘧啶注射液

中图分类号: 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2011)-1-25-4

## Determination of Related Substances of Fluorouracil Injection by HPLC

Xiao Ying Huang Ping Shi Feng (Shandong Institute for Drug Control Jinan 250101)

**Abstract Objective** To establish an HPLC method to detect the related substance of Fluorouracil Injection. **Methods** Refer to some pharmacopias and standards of different countries, working out the proper HPLC-system, optimize and validate subsequently. **Results** The analysis was performed on  $C_{18}$  column with methanol-water (adjusted pH to 3.5 by phosphoric acid) as mobile phase, the detecting wavelength was 265 nm. The experiment indicated that fluorouracil can be well resolved from its related substance. The linear response range was from 0.25 to  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The preparation was stable, the fluctuate of proportion between methanol and water in the mobile phase, pH value of water phase, temperature of column, column brand had little influence on the results of the experiment. **Conclusion** The method was proved to be specific and reliable, and can be used for the quality control of Fluorouracil Injection.

**Key words** HPLC; Fluorouracil Injection related substance

氟尿嘧啶作为临床常用抗癌药物之一, 已有三十多年应用历史。2005年版《中国药典》二部采用紫外-分光光度法测定氟尿嘧啶注射液的含量, 但未对有关物质进行要求。为了进一步提高药品质量, 优化生产工艺, 保障患者用药安全、有效, 参考相关文献, 本文参考国家药品标准 WS<sub>1</sub>-(x-012)-2005Z, 建立并优化了用高效液相色谱法检查氟尿嘧啶注射液有关物质的方法。较目前国外药典 (BP2008 EP5. Q JPX V) 中采用的薄层色谱法, 更为方便准确。

### 1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪; Inertsil  $C_{18}$  色谱柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); Phenomenex ODS-3  $C_{18}$  柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); Shiseido Capcell Pak MG  $C_{18}$  柱 ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 甲醇 (康科德公司, 分析纯); 磷酸 (中国医药集团上海化学试剂有限公司, 分析纯); 磷酸二氢钾 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 氟尿嘧啶原料 (提供生产厂家); 氟尿嘧啶注射液 (A 厂, 批号 050801、

060601、070101; B 厂, 批号 061211、061212; C 厂批号 061104、040705、050425)。

### 2 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱; 以甲醇-水 (用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸调节 pH 值至 3.5) (5:95) 为流动相; 检测波长 265 nm。检测波长的选择参考国家药品标准 WS<sub>1</sub>-(x-012)-2005Z。

### 3 方法与结果

#### 3.1 专属性试验

氟尿嘧啶注射液的有关物质主要有 5-羟基尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶等, 由于无法得到相应的杂质对照品, 无法对其实施准确定位和外标法定量控制。本试验采用加速降解法, 考察原料中各未知有关物质、降解产物间、主成分分离情况。

取本品原料, 每份加空白辅料 0.25 g 共 6 份, 分别进行 (1) 酸破坏实验 (2 M 盐酸溶液 50 mL, 加热回流 5 h 适量氢氧化钠溶液中和); (2) 碱破坏实

验 (2M 氢氧化钠溶液 50 mL, 加热回流 5 h 适量盐酸溶液中); (3) 氧化破坏实验 (0.006 M 高锰酸钾溶液 1.5 mL, 加水至 50 mL, 加热回流 5 h); (4) 加热破坏实验: (加水 50 mL, 加热回流 5 h); (5) 光破坏实验 (5 500 k光照 7 d); (6) 原料空白实验; 用流动相制成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液进样。

同时, 精密称取乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、氢氧化钠适量, 用流动相稀释成适宜浓度, 注入液相色谱仪。考察空白辅料对有关物质检查的干扰。

各组分的 R 值见表 1。

表 1 氟尿嘧啶注射液有关物质的色谱分离情况表

	保留时间	分离度
主峰	5.392	
有关物质 1	7.127	6.25
有关物质 2	8.178	3.1
有关物质 3	8.678	1.41
有关物质 4	11.946	8.21
有关物质 5	17.744	11.72

酸破坏实验表明, 有关物质无明显变化, 氟尿嘧啶原料酸破坏实验不明显。各杂质峰与主峰之间的分离度良好。

碱破坏实验表明, 有关物质明显变化, 碱破坏实验明显。各杂质峰与主峰之间的分离度良好。

氧化破坏实验表明, 各杂质峰与主峰之间的分离度良好。

加热破坏实验表明, 有关物质无明显变化, 各杂质峰与主峰之间的分离度良好。

光破坏实验表明, 有关物质无明显变化, 光破坏实验不明显。各杂质峰与主峰之间的分离度良好。

专属性试验表明, 氟尿嘧啶、各未知有关物质、降解产物的分离情况良好。空白辅料对有关物质检查无干扰。

### 3.2 线性考察

将氟尿嘧啶用流动相分别稀释成  $0.25$ 、 $0.50$ 、 $1$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的溶液, 分别精密量取  $20 \mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。用样品浓度与峰面积做线性方程,  $y = 6642.88740x - 2.71486$ ,  $R^2 = 1.0000$ ; 表明在  $0.25 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, 氟尿嘧啶峰面积与其浓度呈良好线性关系。

### 3.3 检测限的确定

精密称量氟尿嘧啶原料用流动相稀释成  $0.01934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 进样  $20 \mu\text{L}$ , 测得  $S/N = 3.1$  计算得最小检出限为  $0.37 \text{ ng}/20 \mu\text{L}$  ( $0.019$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。表明, 该法灵敏度良好。

### 3.4 方法耐用性

**3.4.1 溶液的稳定性** 取氟尿嘧啶注射液, 用流动相稀释成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 室温下于 0、2、4、6、8、10、12、24、46 h 取  $20 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪。表明, 供试品溶液在室温下放置 46 h, 杂质的组成和单个杂质含量基本没有变化, 其中总杂质含量 (以峰面积和计算) RSD 为 1.24%; 供试品溶液稳定。

**3.4.2 流动相两相比例的影响** 取本品原料, 用流动相制成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 分别在甲醇-水 (用磷酸调节 pH 值至 3.5) 为 10:90、5:95 流动相条件下, 取  $20 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 记录色谱图。试验结果表明, 流动相中有机相和水相比比例变化不大, 杂质的组成和含量变化不大, 有机相比比例增加较大则会使杂质和主峰的分离度变小, 影响结果的准确。有机相比比例过小则会使主峰和杂质的保留时间过长 (以纯水为流动相主峰保留时间延长 1 倍), 增加试验时间。所以, 试验时两者的比例尽量控制在 5:95 为佳。

**3.4.3 流动相中水相 pH 值的影响** 取本品原料, 用流动相制成  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 分别在水相 pH 值分别为 3.7、3.5、3.3 条件下, 取  $20 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 按检测法测定有关物质, 记录色谱图。结果如下:

表 2 流动相中水相 pH 值对有关物质含量测定结果的影响

水相 pH 值	pH 3.7	pH 3.5	pH 3.3
总杂质 %	0.42	0.43	0.43

试验表明, 当水相 pH 值为  $3.5 \pm 0.2$  时, 有关物质的测定结果基本一致。

**3.4.4 柱温的影响** 同一样品分别  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$  的柱温下进样, 计算总杂质的含量分别为 0.26%、0.26%、0.27%, 可见测定结果基本一致。

**3.4.5 不同品牌  $C_{18}$  色谱柱对结果的影响、自身对照法和面积归一化法的确定及样品的测定** 选用三种不同品牌的十八烷基键合硅胶柱 (Phenomenex  $C_{18}$  柱、Inertsil ODS-3 柱、日本资生堂 Shiseido Capcell Pak  $C_{18}$  柱), 考察三厂家八批样品, 分别采用自身对照法和面积归一化法做, 结果见表 3。上述试验结果表明, 三种不同品牌的十八烷基键合硅胶柱, 用自身对照法和面积归一化法得到的最大杂质及总杂质的含量基本一致。说明本法耐用性较好。本品在 0.25% ~ 100% 供试品浓度范围内呈线性关

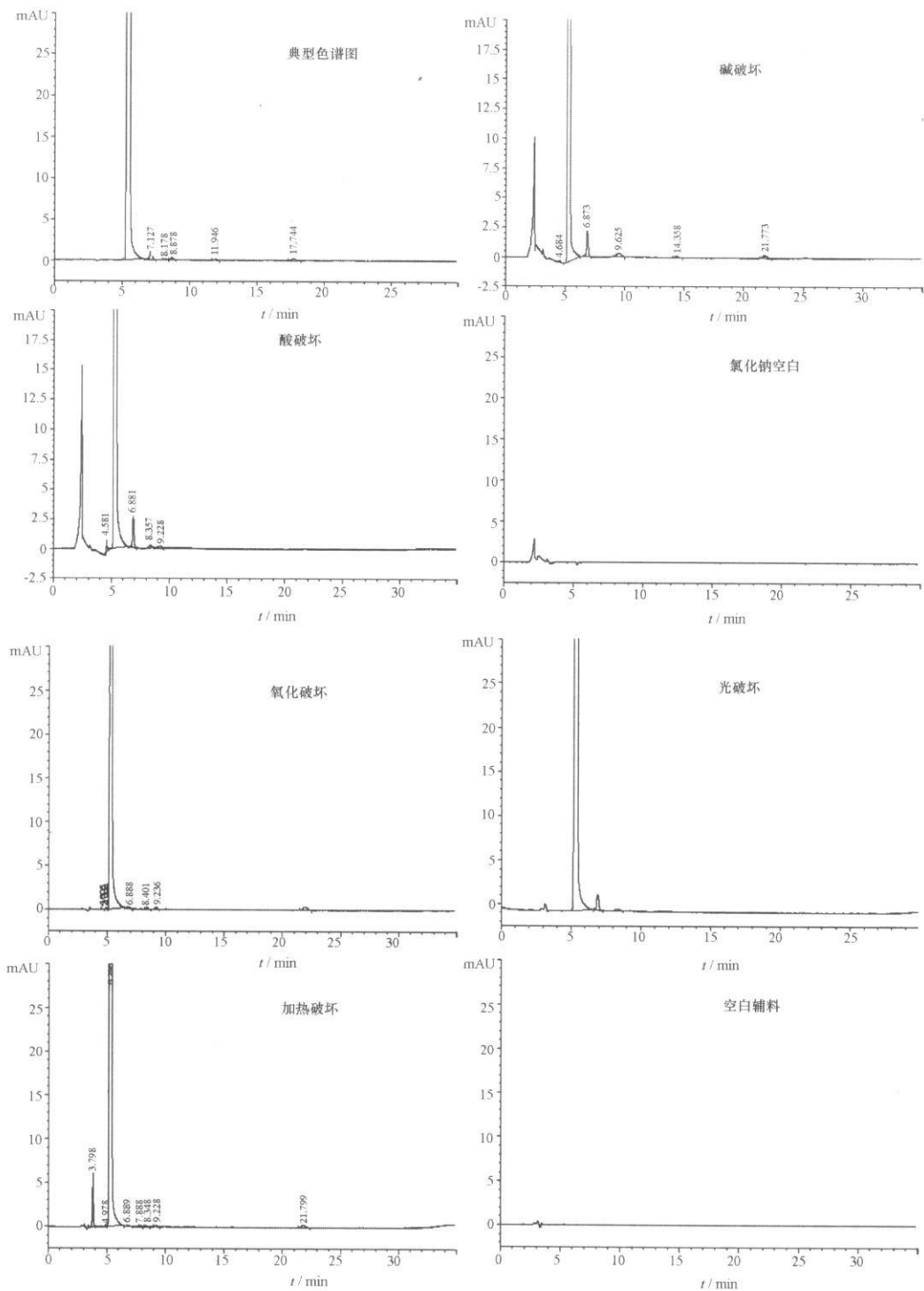


图 1 专属性试验色谱图

系,而面积归一化法,通常用于粗略考察供试品中的杂质含量。选用自身对照法更为准确可靠。

### 3.5 记录时间的确定

上述测定条件下,色谱图中明显可见的有关物质最大保留时间约在 3~ 4倍主峰保留时间之间,确定记录时间为主峰保留时间的 5倍。

### 3.6 结果

根据上述实验结果,制订氟尿嘧啶注射液有关物质检查方法,照高效液相色谱法(《中国药典》2005年版附录 V D)测定。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-水(用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸

调节 pH 值至 3.5) (5:95) 为流动相; 检测波长为 265 nm。理论板数按氟尿嘧啶峰计算应不低于 2 500。氟尿嘧啶峰与相邻杂质峰的分离度应大于 1.5。

表 3 三种不同色谱柱两种结果计算方法检测 8 批样品有关物质结果

色谱柱	厂家	批号	自身对照法		面积归一化法	
			最大杂质 %	总杂质 %	最大杂质 %	总杂质 %
			质 %	质 %	质 %	质 %
henan en ex C <sub>18</sub> 柱	A 厂	050 801	0.20	0.43	0.18	0.38
		070 101	0.24	0.47	0.21	0.42
		060 601	0.35	0.48	0.31	0.43
	B 厂	061 212	0.32	0.44	0.30	0.41
		061 211	0.33	0.45	0.30	0.41
		050 425	0.05	0.11	0.05	0.10
C 厂	040 705	0.06	0.13	0.05	0.12	
	061 104	0.05	0.13	0.05	0.13	
	050 801	0.21	0.29	0.19	0.26	
h ertsil ODS-3柱	A 厂	070 101	0.25	0.33	0.24	0.31
		060 601	0.34	0.47	0.33	0.44
		061 212	0.33	0.44	0.32	0.43
	B 厂	061 211	0.32	0.44	0.31	0.42
		050 425	0.04	0.07	0.04	0.06
		040 705	0.04	0.08	0.03	0.08
C 厂	061 104	0.04	0.09	0.03	0.09	
	050 801	0.18	0.38	0.18	0.38	
	070 101	0.21	0.41	0.21	0.43	
日本资生堂	A 厂	060 601	0.31	0.50	0.32	0.51
		061 212	0.30	0.44	0.31	0.45
Sh ise ilo	B 厂	061 211	0.33	0.47	0.31	0.44
		050 425	0.04	0.12	0.04	0.12
Capcell Pak	C 厂	040 705	0.06	0.15	0.05	0.14
		061 104	0.06	0.15	0.06	0.14

测定法取本品适量, 加流动相制成每 1 mL 中含 0.1 mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取供试品

溶液制成每 1 mL 约含 0.25 μg 的溶液作为对照溶液; 精密量取对照溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使氟尿嘧啶峰的峰高约为满量程的 10%, 再精密量取供试品溶液与对照溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 5 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰 (溶剂峰和辅料峰除外), 单个杂质的峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 2 倍 (0.5%), 各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 3 倍 (0.75%)。

#### 4 讨论

原料加速降解实验表明, 氟尿嘧啶容易被碱和氧化剂破坏, 光照和温度对氟尿嘧啶的稳定性影响不大。常温下氟尿嘧啶注射液比较稳定。因此可以推测氟尿嘧啶注射液中的有关物质主要来源于原料的合成工艺。而药典中原料未控制有关物质, 建议对原料增订该项检查。

高效液相色谱法检查氟尿嘧啶注射液有关物质, 灵敏高、专属性强、操作简便、重复性好。我们仅对三个企业 8 批同规格样品进行检测, 结果为 A、B 二企业的有关物质含量基本一致, 而 C 企业产品有关性质含量明显低于上述二企业, 仅为上述二企业的 1/5。故建议国家药典委员会要求更多的生产企业提供相关数据, 以便能制定适宜限度。

#### 参考文献

- [1] 党全训. 1-乙酰基-3-邻甲基苯甲酰基-5-氟尿嘧啶含量及其杂质的高效液相色谱测定 [J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3): 234.
- [2] 张丽娜, 雷国峰, 余江天, 等. 复方氟尿嘧啶乳剂中氟尿嘧啶含量测定、体外释放及制剂的安全性评价 [J]. 中国药理学杂志, 2006 4(1): 1-6.

## 高效液相色谱法测定痔疮消炎颗粒中金丝桃苷的含量

覃忠子, 韦建乔, 曾友保, 覃丽娜 (广西壮族自治区河池食品药品检验所, 河池 547000)

**摘要** 目的: 建立痔疮消炎颗粒中金丝桃苷的含量测定方法。方法: 采用 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸溶液 (46:54) (用三乙胺调 pH 至 3.0), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长为 360 nm, 柱温 30 °C, 理论板数按金丝桃苷峰计算应不低于 3 000 进样量为 10 μL。结果: 金丝桃苷在 0.121 7~1.521 0 μg 线性范围时呈良好的线性关系 (r = 0.999 9), 平均回收率为 103.5%, RSD 为 1.27% (n = 6)。结论: 本方法准确, 重现性好, 可作为痔疮消炎颗粒质量控制方法。

**关键词:** 痔疮消炎颗粒; 金丝桃苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2011)-1-28-4

作者简介: 覃忠子, 男, 高级工程师。学科及研究方向: 药物合成分析。联系电话: 13907789066。