

羟丙基-磺丁基- β -环糊精包合物 冻干粉中多烯紫杉醇的含量及其有关物质测定

葛文娜¹, 吴淑燕¹, 刘爱¹, 任勇², 余书勤², 许茜^{1*}

(1 东南大学公共卫生学院, 南京 210009; 2 南京师范大学江苏省医药超分子材料及应用重点实验室, 南京 210076)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定羟丙基-磺丁基- β -环糊精包合物冻干粉中多烯紫杉醇的含量及其有关物质。方法: 采用 Diamak Phtisil_{C₁₈}柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 检测波长 227 nm, 柱温: 30℃。有关物质检查时以乙腈-水 (40: 60 *v/v*) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 流速 1.5 mL · min⁻¹; 含量测定时紫杉醇为内标, 以乙腈-水 (60: 40 *v/v*) 为流动相, 进行等度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹。结果: 多烯紫杉醇与各有关物质分离良好。在 0.05~100 μ g · mL⁻¹ 的浓度范围内多烯紫杉醇浓度与多烯紫杉醇/紫杉醇峰面积比之间具有良好的线性关系 ($r=0.9993$); 重复性好 (RSD < 1%); 平均回收率为 100.1% ($n=9$); 检出限为 0.01 μ g · mL⁻¹ ($SN=3$)。结论: 本法准确可靠, 专属性强, 能满足多烯紫杉醇包合物冻干粉质量控制的要求。

关键词: 多烯紫杉醇; 羟丙基-磺丁基- β -环糊精; 有关物质; 含量; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0582-05

Determination of docetaxel and its related substances in freezing dried hydroxypropyl- sulfur butyl- β - cyclodextrin inclusion complex

GE Wen-na¹, WU Shu-yan¹, LIU Ai¹, REN Yong², YU Shu-qin², XU Qian^{1*}

(1. School of Public Health Southeast University, Nanjing 210009 China)

2 Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory of Medical Supramolecular Materials and Applications, Nanjing 210076 China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for determination of docetaxel and its related substances in inclusion complex. **Method** The separation was performed on a Diamak Phtisil_{C₁₈} column (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m). The column was maintained at 30℃ and the UV detector was set at 227 nm. Acetonitrile-water (40: 60 *v/v*) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B to carry out gradient elution at a flow rate 1.5 mL · min⁻¹ for the determination of related substances. For the content determination, using acetonitrile-water (60: 40 *v/v*) as mobile phase to carry out isometric elution at a flow rate 1.0 mL · min⁻¹, Paclitaxel was used as internal standard. **Result** Docetaxel and its related substances could be baseline separated. A linearity between the peak area ratio of docetaxel/internal standard and docetaxel concentration was achieved in the range of 0.05~100 μ g · mL⁻¹ with $r=0.9993$. The average recovery was 100.1% ($n=9$). The limit of detection was 0.01 μ g · mL⁻¹ ($SN=3$). **Conclusion** This method is sensitive, accurate and satisfactory in the separable effect and can be used for quality control of docetaxel inclusion complex.

Key words docetaxel; hydroxypropyl- sulfur butyl- β - cyclodextrin; related substances; content; RP-HPLC

多烯紫杉醇 (docetaxel) 是近年开发的新一代紫杉烷类抗肿瘤药物, 其结构式如图 1 所示。多烯紫杉醇的作用机制与紫杉醇类似, 但在细胞内浓度比紫杉醇高 3 倍, 并在细胞内滞留时间长, 抗肿瘤活性是紫杉醇的 1.3~12 倍, 对乳腺癌、非小细胞肺癌等

癌症均有明显疗效^[1]。但是多烯紫杉醇是脂溶性物质, 水溶性很差, 因此其口服生物利用度很低 (<10%)^[2,3], 而市售注射液中的增溶溶媒吐温 80 和 13% 乙醇易引起过敏反应^[4], 限制了其临床应用。研究表明, 环糊精包合不仅能增加药物的溶解度和

* 通讯作者 Tel: (025) 83272563 E-mail: xutiang@sohu.com

溶出速率,减少不良反应,还可以提高药物的生物利用度和稳定性^[4-6]。羟丙基-磺丁基-β-环糊精是以羟丙基和磺丁基混合取代的环糊精衍生物,是南京师范大学江苏省医药超分子材料及应用重点实验室的专利产品,作为药物赋形剂水溶性好、溶血性小、毒性低^[7]。在此基础上,开发了多烯紫杉醇羟丙基-磺丁基-β-环糊精包合物冻干粉这一新的剂型,为进行质量控制,本文建立了反相高效液相色谱法检测其中多烯紫杉醇的含量及其有关物质。

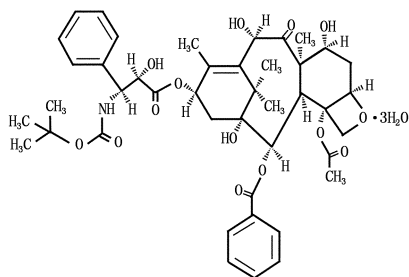


图 1 多烯紫杉醇结构式
Fig 1 Structure of docetaxel

1 仪器与试剂

日本 SHIMADZU LC-10ADVP 高效液相色谱仪; SPD-10AVP 紫外检测器; TL-9900 色谱工作站。

多烯紫杉醇对照品 (Sigma 公司产品, 本文色谱条件下, 峰面积归一化法测得纯度为 99.1%), 紫杉醇对照品 (Sigma 公司产品, 本文色谱条件下, 峰面积归一化法测得纯度为 99.5%), 测试样品 (多烯紫杉醇羟丙基-磺丁基-β-环糊精包合物冻干粉, 南京师范大学江苏省医药超分子材料及应用重点实验室

提供, 标示量: 4%)。乙腈为色谱纯, 水为纯净水。

2 有关物质测定

2.1 色谱条件和系统适用性

色谱柱: Dikma platasil C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (40: 60 v/v) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 进行梯度洗脱, A 与 B 的比例变化情况: 0~31 min A-B 的比例由 100:0 线性变化至 33:67, 继续洗脱 9 min, 40~50 min A-B 的比例为 0:100 保持 5 min, 流速: 1.5 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 227 nm; 进样量 20 μL。

理论板数按多烯紫杉醇计算不低于 5000 多烯紫杉醇与相邻杂质峰的分度大于 1.5。

2.2 方法专属性试验 取测试样适量 (约相当于多烯紫杉醇 10 mg) 共 5 份, 先取 2 份分别放于 105 °C 烘箱加热 24 h 以及照度为 4500 lx 的光照箱内 48 h 之后加乙腈-水 (1:1) 溶解并稀释至 10 mL。另 3 份分别以 5 mL 乙腈-水 (1:1) 完全溶解后, 分别加 1.0 mol · L⁻¹ 盐酸 1.0 mL、0.2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.1 mL 和 30% 过氧化氢溶液 2.0 mL 混匀后均在室温下暗处放置 5 h 酸、碱破坏后的溶液先调至中性, 加乙腈-水 (1:1) 稀释至 10 mL。以上样品均滤过后取续滤液进样测定。同时未经破坏的测试样做对照, 并测试空白辅料。结果见图 2。结果表明, 空白辅料不干扰测试样的测定; 测试样在酸、碱、氧化、高热、光照条件下都有不同程度的破坏, 产生的降解产物均能与主峰完全分离, 说明本法的专属性良好。从色谱图中也可以粗略推断在碱破坏条件下, 样品不稳定, 样品对酸、氧化物、高热、光照相对稳定。

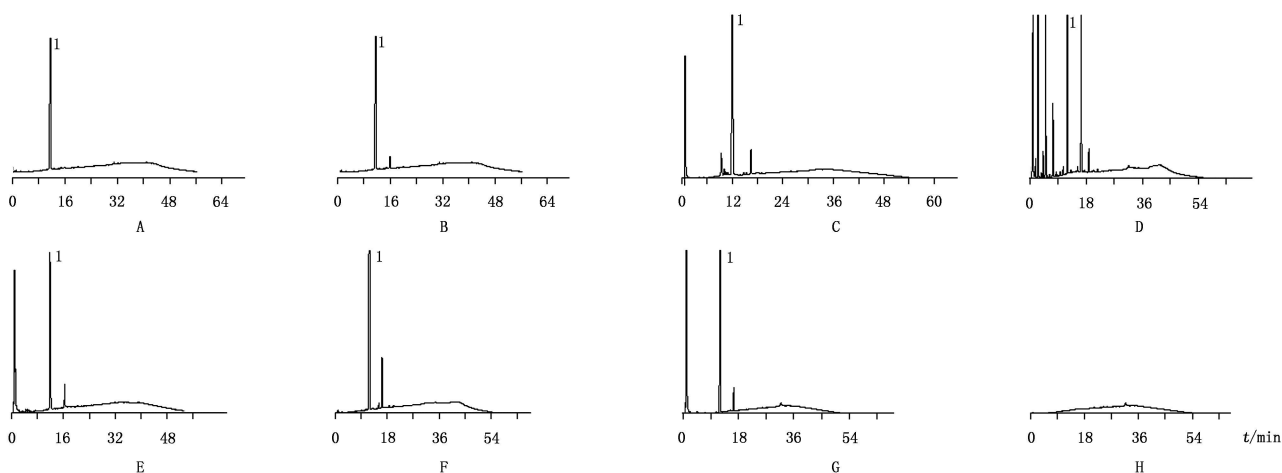


图 2 方法专属性试验色谱图

Fig 2 Chromatograms of the specificity validation

A. 多烯紫杉醇对照品 (reference standard of docetaxel) B. 未经破坏样品 (original sample) C. 酸破坏样品 (sample destroyed by acid) D. 碱破坏样品 (sample destroyed by alkali) E. 氧化破坏样品 (sample destroyed by oxidation) F. 热破坏样品 (sample destroyed by on heating) G. 光破坏样品 (sample destroyed by light) H. 空白辅料溶液 (excipient solution)

1 多烯紫杉醇 (docetaxel)

2.3 有关物质测定 取测试样品适量 (相当于多烯紫杉醇 10 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-水 (1:1) 溶解并稀释至刻度, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 加乙腈-水 (1:1) 稀释 100 倍作为对照溶液。取对照溶液 20 μ L 注入色谱仪, 调节检测灵敏度, 使对照溶液中的主成分色谱峰的峰高约为记录仪满刻度的 20%。取供试品溶液 20 μ L 注入色谱仪, 记录色谱图。有关物质按其峰面积总和与对照溶液的主峰面积之比进行计算。3 批测试样品测定结果见表 1。

表 1 测试样品中多烯紫杉醇有关物质和含量测定结果 (%)

Tab 1 Results of related substances and determination content of docetaxel in samples

批号 (Lot No.)	标示含量 (labeled amount) %	有关物质含量 (content of related substance) %
070910	98.79	2.8
070915	99.56	2.2
070920	100.9	2.5

3 含量测定

3.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱: Dikma platasil C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (60:40 *v/v*) 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 227 nm; 进样量 20 μ L。

理论板数按多烯紫杉醇峰计算应不低于 5000 对称因子 1.05。多烯紫杉醇峰和内标物质峰分离度应大于 1.5。取同一对照品溶液, 连续进样 5 次, 色谱峰面积的 RSD 为 0.18%。

3.2 方法专属性试验 取“含量测定”项下的供试品溶液, 在上述色谱条件下进行测定, 记录色谱图。按处方比例, 以流动相配制浓度与供试品溶液中含主成分相当的空白辅料溶液 (约为 480 μ g $\cdot$ mL⁻¹), 进样, 记录色谱图。见图 3。结果证明: 空白辅料对主峰及内标峰无干扰。多烯紫杉醇峰和内标物质峰分离度良好。

3.3 线性关系考察 取减压干燥至恒重的多烯紫杉醇对照品约 10 mg 精密称定, 以乙腈溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量以乙腈稀释成浓度为 200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 和 2.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液。取减压干燥至恒重的紫杉醇对照品约 10 mg 精密称定, 以乙腈溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 作为内标储备液。精密量取内标储备液适量, 以乙腈稀释成浓度为 20 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的内标溶液。精密量取对照品溶液及内

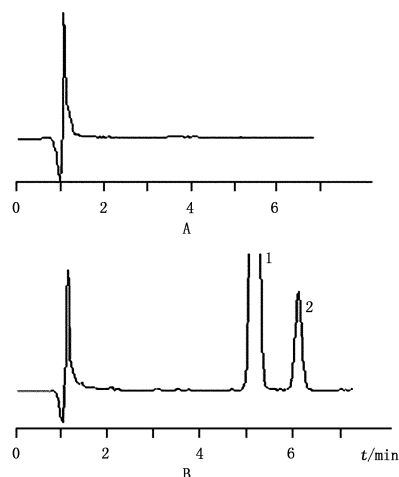


图 3 含量测定用空白辅料溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of excipient and sample for assaying in determination content of docetaxel

A. 空白辅料溶液 (excipient solution) B. 供试品溶液 (sample solution)

1. 多烯紫杉醇 (docetaxel) 2. 紫杉醇 (paclitaxel)

标溶液适量, 以流动相稀释制成多烯紫杉醇浓度分别为 0.05, 0.1, 0.2, 2.0, 20, 50, 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 内标溶液浓度均为 2.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液, 在上述色谱条件下分别进样 20 μ L 进行测定, 计算多烯紫杉醇与紫杉醇的峰面积比 (*F*)。结果表明, 多烯紫杉醇溶液浓度 (*C*) 在 0.05~100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 浓度范围内, 与 *F* 之间具有良好的线性关系。回归方程为:

$$F = 0.0235 + 0.3125C \quad r = 0.9993$$

3.4 检出限和定量限 精密量取浓度为 2.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的多烯紫杉醇对照品溶液, 以流动相稀释制成浓度为 0.01~0.05 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的系列溶液, 分别进样 20 μ L, 记录色谱图。按信噪比 (*SN*) 为 3:1, 测得多烯紫杉醇的检出限为 0.01 μ g $\cdot$ mL⁻¹; 按信噪比 (*SN*) 为 10:1, 测得多烯紫杉醇的定量限为 0.05 μ g $\cdot$ mL⁻¹。

3.5 重复性试验 精密称取同一批号的多烯紫杉醇样品 6 份, 按“含量测定”项下方法操作, 分别测定其标示含量。结果平均标示含量为 99.3%, RSD 为 0.52%。

3.6 回收率试验 预先按处方量称取适量的空白辅料 9 份, 分别置干燥洁净的研钵中, 然后按处方量的 80%, 100%, 120%, 取减压干燥至恒重的多烯紫杉醇对照品各 3 份, 精密称定, 分别与空白辅料充分研磨混匀。精密称取一定量, 加流动相适量, 超声溶解后, 以流动相稀释成终浓度分别为 16.0, 20.0, 24.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 内标溶液浓度均为 2.0 μ g $\cdot$ mL⁻¹

的溶液各 3 份,按“含量测定”项下方法测定,记录色谱图,将多烯紫杉醇与紫杉醇的峰面积比代入回归方程计算,低、中、高 3 个加标水平平均回收率测定结果分别为 99.9% (RSD = 1.1%), 99.4% (RSD = 1.0%), 101.0% (RSD = 0.59%); 9 份样品的回收率平均值为 100.1% ($n=9$)。

3.7 稳定性试验 取“含量测定”项下的供试品溶液 1 份,室温下放置,分别在 0 2 4 8 12 24 h 时取 20 μL 注入色谱仪,将测得的多烯紫杉醇与紫杉醇的峰面积比与 0 h 相比,在 24 h 内 RSD 为 0.62%,表明溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

3.8 含量测定 取减压干燥至恒重的多烯紫杉醇对照品适量,精密称定,加乙腈制成 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,取此溶液和 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液各 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加流动相定容、混匀,作为对照品溶液。精密称取本品适量 (约相当于多烯紫杉醇

10 mg),置 50 mL 量瓶中,加流动相约 10 mL 超声溶解后,加 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 1.0 mL,以流动相稀释至刻度,混匀,滤过,精密量取续滤液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加流动相定容、混匀,作为供试品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,测定峰面积,以内标法计算出样品中多烯紫杉醇的标示含量。测定结果见表 1。

4 讨论

4.1 前期试验中我们用含量测定项下的等度色谱条件测定有关物质,以流动相配制供试品溶液,进样分析,结果见图 4。结果表明,梯度洗脱较等度洗脱可使杂质峰尽可能地分离、检出,相邻杂质与主峰,以及杂质间的分离度良好,提高了方法的准确度和专属性。

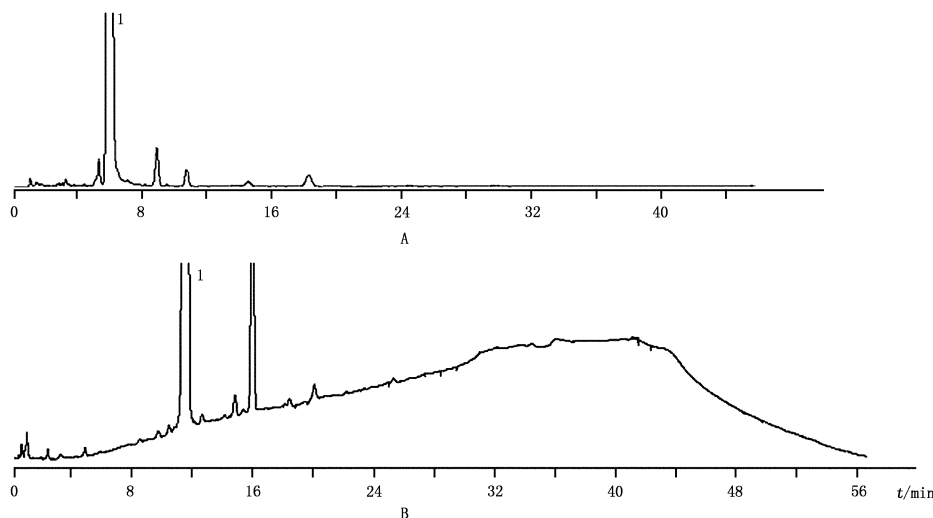


图 4 不同色谱条件下有关物质测定色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms of related substances with different chromatographic conditions

A. 等度色谱条件 (equality elution chromatographic conditions) B. 梯度色谱条件 (gradient elution chromatographic conditions)

1. 多烯紫杉醇 (docetaxel)

4.2 有关物质检查试验中流动相的变化对多烯紫杉醇的保留时间和杂质的分离度影响较大。曾尝试 A 相为 60% 的乙腈, B 相为 80% 的乙腈, 31 min 时 B 相从 0% 达 100%, 多烯紫杉醇保留时间较长, 为 20.75 min 且 4 min 之前的杂质峰较密集, 不能完全分离。采用本文流动相, 保留时间为 12.36 min, 杂质峰都能很好的分离, 缩短了检测时间, 改善了分离。

4.3 含量测定采用等度洗脱, 合理地简化了方法, 提高了工作效率。前期试验中分别进行了外标法和内标法进行含量测定项下的回收率试验, 外标法测

得低、中、高 3 个水平平均回收率结果分别为 97.6% (RSD = 1.3%), 98.8% (RSD = 2.7%), 99.1% (RSD = 1.6%), 9 份样品的回收率平均值为 98.5% ($n=9$)。结果证明采用内标法定量, 较外标法具有更高的准确度, 且本文选择与多烯紫杉醇结构、性质相似的紫杉醇作内标, 检测波长和灵敏度相近, 进一步提高了方法的准确度。多烯紫杉醇和内标的保留时间分别为 4.65 min 和 5.58 min, 实测分离度大于 4.0。

4.4 多烯紫杉醇在乙腈中溶解, 但其环糊精包合物及辅料易溶于水, 因此配制供试品溶液时用乙腈 -

水混合溶剂,样品能很快地全部溶解,保证了实验结果的准确性。

参考文献

- 1 Hong W K., *Oncology*, 2002, 16: 9
- 2 Newman S P, Foster P A, Rho Y T, *et al* The therapeutic potential of a series of orally bioavailable antiangiogenic microtubule disruptors as therapy for hormone-independent prostate and breast cancers *Brit J Cancer*, 2007, 97 (12): 1673
- 3 Kuppens IELM, Bosch TM, van Maanen M J, *et al* Oral bioavailability of docetaxel in combination with OC144-093 (ONT-093). *Cancer Chemoth Pharm*, 2005, 55 (1): 72
- 4 ZHANG Xue-nong (张学农), TANG Li-hua (唐丽华), YAN Xue-ying (阎雪莹), *et al* Solubilization of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin to paclitaxel and its relative molecular inclusion mechanism (羟丙基- β -环糊精对紫杉醇的增溶作用及其分子包含机制研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38(9): 1317
- 5 DING Ping-tian (丁平田), WU Xue-mei (吴雪梅). A new excipient of medical preparation-2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (药物制剂的新型辅料 2-羟丙基- β -环糊精). *World Pharmacy* (国外医药-合成药、生化药、制剂分册), 1996, 17 (2): 107
- 6 WANG Jian-hua (王建华), SONG Ai-jing (宋爱晶). Progress in pharmaceutical applications of a new excipient sulfolbutyl- β -Cyclodextrins (一种新型辅料磺丁基醚- β -环糊精的药学应用进展). *Mater J* (材料导报), 2007, 21(3): 40
- 7 REN Yong (任勇), MA Xue-qin (马学琴), YU Shu-qin (余书勤), *et al* Hydroxypropyl-sulfur butyl-cyclodextrin and its preparation, analytical method applications in pharmaceutical (羟丙基-磺丁基- β -环糊精及其制备方法、分析方法以及在药学上的应用), CN 1800221, 2006-07-12
- 8 LIXiao-feng (李晓峰), SHI Bing-xing (石炳兴), YUAN Ying-jin (元英进), *et al* Assay of related substances of docetaxel and its injection by HPLC (RP-HPLC 法测定多烯紫杉醇及注射浓缩液的含量及有关物质). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(11): 991
- 9 Dinesh Kumar Rajesh Singh Tomar Santosh Kumar Deolia, *et al* Isolation and characterization of degradation impurities in docetaxel drug substance and formulation. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 43: 1228
- 10 B. Mallikarjuna Rao Arpita Chakraborty Srinivasu MK, *et al* A stability-indicating HPLC assay method for docetaxel. *J Pharm Biomed Anal* 2006, 41: 676

(本文于 2008 年 5 月 30 日修改回)

《药物分析杂志》稿件在线管理系统已开通

本刊于 2008 年 10 月 23 日开通稿件在线管理系统。从即日起,凡投稿本刊,请登录 <http://www.ywfxzz.cn> 进行网上投稿。

该系统采用 E-mail 作为用户名进行注册。

网上投稿的同时需寄单位介绍信及稿件处理费 50 元。

作者在线投稿后,可在线了解稿件情况:编辑-送审-待修改-退修-待发表-已刊出等。

20080580 号以前的作者可与编辑部联系修改用户名后,登录此系统。

读者可在线查看本刊目录,了解本刊编委及其他信息,也可在线订阅本刊。

投稿过程中如遇技术问题,请与技术支持联系:010-69296712。

谢谢合作!

《药物分析杂志》编辑部