

高效液相色谱法测定注射用福莫司汀有关物质和含量

杨玉敏^①, 窦媛媛^②, 王洪权^②, 吴海燕^①

摘要 目的 建立注射用福莫司汀含量测定及有关物质检查的高效液相色谱测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸二氢铵 (2:1.5, V/V); 流速: 1 ml/min; 紫外检测波长: 230 nm。结果 进样量在 0.05 ~ 10.00 μg 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系 ($r = 0.9998$); 福莫司汀平均回收率为 99.72%, RSD 为 0.16%; 所检测的有关物质含量约为 0.5%。结论 该法简便、快速, 结果准确、可靠, 重复性好, 可用于注射用福莫司汀含量测定及有关物质检查。

关键词 福莫司汀; 有关物质; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

文章编号 1008-9926(2011)06-0535-03

DOI 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.06.022

Determination of Related Substances and Content of Fotemustine for injection by High Performance Liquid Chromatography

YANG Yu-min^①, DOU Yuan-yuan^②, WANG Hong-quan^②, WU Hai-yan^①

^①Department of Pharmacy, The General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China;

^②State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

[Abstract] **Objective** To establish an high performance liquid chromatography method for the content determination of Fotemustine for injection and related substances. **Methods** The assay was conducted on a Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and the mobile phase was methanol-0.2% ammonium phosphate monobasic (2:1.5, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 230 nm. **Results** The linear range for Fotemustine was 0.05–10.00 μg ($r = 0.9998$). The average recovery rate was 99.72%, and RSD was 0.16%. The related substances accounted for about 0.5%. **Conclusion** This method can be applied to quantitative determination of Fotemustine for injection.

[Key words] fotemustine; the related substances; content determination; high performance liquid chromatography

福莫司汀为第三代亚硝基脲类药物, 对黑色素瘤疗效优于同类药物, 其抗肿瘤机制主要是抑制肿瘤细胞 DNA 的合成, 目前已进行了广泛的临床研究^[1]。用于头颈部癌、脑瘤、肺癌、胃癌、直肠癌、食管癌和恶性淋巴瘤等, 适用于晚期病人, 可与其他抗肿瘤药合并使用, 在国内已有研究和上市, 上市制剂为冻干粉针剂^[2,3]。关于用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定注射用福莫司汀的含量和有关物质目前尚未见报道, 为控制该制剂的质量, 本文建立了 HPLC 法测定注射用福莫司汀的含量和有关物质, 该法准确、重复性

好, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试药

1100 series 液相色谱系统: DAD 检测器 (Agilent 公司); 福莫司汀对照品 (纯度: 99.2%, 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 批号: 20100201); 注射用福莫司汀 (规格: 208 mg/支, 菏泽睿鹰制药集团有限公司, 批号: 20070501、20081001、20090801); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

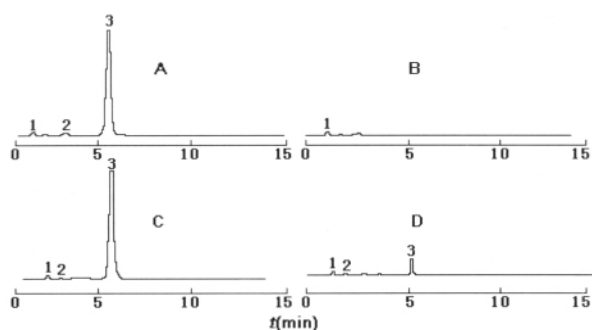
2 含量测定

2.1 系统适应性试验 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸二氢铵, (2:1.5, V/V); 检测波长: 230 nm; 流速: 1 ml/min; 进样量: 5 μl; 以福莫司汀计算柱效, 理论塔板数不低于 3000, 各杂质峰与主峰分离较好, 见图 1。

作者简介: 杨玉敏, 药师。研究方向: 药剂学。Tel: (010) 66721283; E-mail: yangyuminandfj@163.com

作者单位: ① 100700 北京, 北京军区总医院药剂科; ② 100071 北京, 军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物安全国家重点实验室

通讯作者: 吴海燕, Tel: (010) 66721283, E-mail: tm1993926@sina.com



A: 供试品溶液; B: 阴性对照溶液; C: 对照品溶液;

D: 有关物质阳性对照溶液(稀释 100 倍);

1: 溶剂; 2: 杂质; 3: 福莫司汀

图 1 注射用福莫司汀 HPLC 图

2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 取福莫司汀对照品约 25 mg, 精密称定, 置 50 ml 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解、稀释至刻度, 摇匀。(2) 供试品溶液 取注射用福莫司汀适量(含福莫司汀约 25 mg), 精密称定, 置 50 ml 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解、稀释至刻度, 摇匀。(3) 有关物质阳性对照溶液 取供试品溶液 1 ml 置 100 ml 棕色量瓶中加甲醇稀释至刻度, 摇匀;(4) 阴性对照液 取甲醇作为阴性对照液。

2.3 线性关系的考察 取福莫司汀对照品约 100 mg, 精密称定, 置 50 ml 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度。再依次将其稀释 2、5、10、25、50、100、200 倍, 分别进样 5 μ l, 记录色谱图, 得到的峰面积(Y)与进样量(X)的线性方程为:

$$Y = 994.45X + 22.96, r = 0.9998$$

进样量在 0.05 ~ 10.00 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密称取供试品溶液(批号: 20070501) 6 份, 测定注射用福莫司汀含量平均值为 99.72%, RSD 为 0.16%。

2.5 回收率试验 取约为供试品溶液浓度的 80%、100%、120% 各 3 份, 精密称定, 分别置 50 ml 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 进样 5 μ l, 按外标法以峰面积计算, 结果见表 1。

2.6 供试品溶液稳定性 取对照品溶液分别放置在棕色和白色容量瓶中, 室温下放置, 样品依法处理后测定。在棕色量瓶中, 注射用福莫司汀的甲醇溶液 24 h 内测定峰面积, 平均峰面积值为 3275.07, RSD 为 1.87%; 在白色量瓶中, 注射用福莫司汀的甲醇溶液 24 h 内测定峰面积, 平均峰面积值为 2459.35, RSD 为 32.53%。结果表明, 在白色量瓶中注射用福莫司汀的甲醇溶液极其不稳定; 在棕色量瓶中注射用福莫司汀的甲醇溶液在 24 h 内是稳定的。

的甲醇溶液在 24 h 内是稳定的。

表 1 福莫司汀的回收率试验结果

加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	$\bar{x}$ (%)	RSD (%)
20.11	20.01	99.50		
19.97	19.92	99.75		
20.24	20.17	99.65		
25.12	25.11	99.96		
25.43	25.34	99.65	99.69	0.15
25.80	25.76	99.84		
29.96	29.82	99.53		
30.82	30.73	99.71		
30.51	30.39	99.61		

2.7 样品含量测定 取 3 批供试品(批号分别为: 20070501、20081001、20090801), 按 2.2(2) 的制备方法制备供试品溶液, 依 2.1 项下色谱条件测定, 测得样品含量分别为 (98.84 $\pm$ 0.13) %、(99.03 $\pm$ 0.16) %、(98.61 $\pm$ 0.12) %。

3 有关物质检测

3.1 系统适应性试验 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸二氢铵, (2:1.5, V/V); 检测波长: 230 nm; 流速: 1 ml/min; 进样量: 5 μ l; 以福莫司汀计算柱效, 理论塔板数为不低于 3000, 各杂质峰与主峰分离。

3.2 色谱系统分离效果 取注射用福莫司汀适量(含福莫司汀 50 mg), 共 3 份, 分别置 100 ml 烧瓶中, 分别以下列条件试验: (1) 酸破坏: 加 0.1 mol/L 的盐酸 20 ml, 置沸水浴中加热回流 2 h, 放冷, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中和。(2) 碱破坏: 0.1 mol/L 的氢氧化钠 20 ml, 置沸水浴中加热回流 2 h, 放冷, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液中和。(3) 氧化破坏: 加 30% 过氧化氢溶液 20 ml, 室温放置 6 h。结果表明酸、碱、氧化降解产物色谱峰的保留时间均在 4 min, 主峰保留时间为 5.5 min, 主峰保留时间与降解峰保留时间完全分离。

3.3 最低检测限 取供试品溶液数倍稀释后, 进样 5 μ l, 当主峰高为噪音峰高的 3 倍时进样量即为最低检测限, 本品最小检测量为 4.06 ng。

3.4 有关物质测定 按上述方法检测了 3 批样品(批号: 20070501、20081001、20090801), 测得有关物质含量分别为 0.24%、0.19%、0.24%。3 批样品有关物质(面积归一化法)测定结果表明, 有关物质按上述法含量均小于 1.0%。(下转 539 页)

冰醋酸涂剂放置的时间越久,生成的乙酸乙酯越多。

4 讨论

按酯化反应原理,在高温或催化剂的条件下才能发生酯化反应,但本实验结果提示,冰醋酸涂剂中的有关物质为乙酸乙酯。高含量的醋酸与乙醇在室温下可逐渐反应生成乙酸乙酯,已经由气相色谱完全确证。从气相色谱图可以看出,除乙醇、乙酸和乙酸乙酯的色谱峰外,没有其它峰,表明无其他副产物产生。醋酸与溶剂乙醇发生反应,生成乙酸乙酯,在某一时间,反应即趋平衡^[6]。从不同批号的冰醋酸涂剂的含量测定结果看,约半年后达到平衡。

本实验可看出,30% 醋酸水溶液样品稳定,但其涂抹时要避免接触指甲以外的皮肤,刺激性较大,不安全;除此,醋酸水溶液不易透过皮肤进入用药部位,疗效不好。用乙醇配制的冰醋酸涂剂疗效好,而且安全,但不稳定,放置 1 个月后,常温下醋酸含量下降近 10%,而冰箱中含量下降 5% 左右。鉴于冰醋酸涂剂的不稳定性,该制剂应放在冰箱中贮藏。

鉴于该制剂的刺激性小,临床使用安全,下一步要考察冰醋酸涂剂在冰醋酸多大浓度下对治疗灰指甲还有效,确定冰醋酸的最小有效浓度,规定冰醋酸不少于多少,从而导出该药的有效期。

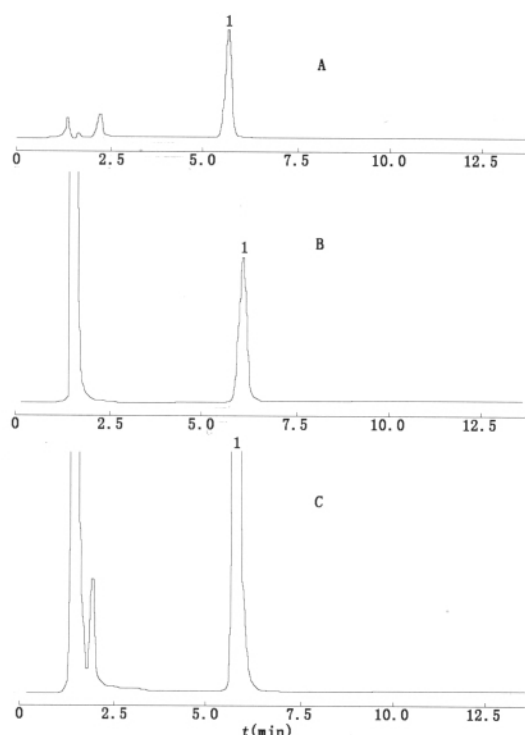
参考文献

- [1] 中国医师协会皮肤科医师分会皮肤真菌学亚专业委员会. 甲真菌病的诊疗难点和个体化策略 [J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(2): 116-118
- [2] 吴一菲,曹 萍,王晓川. 5% 阿莫罗芬甲擦剂治疗甲真菌病的临床疗效观察 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(11): 724-725
- [3] 刘晓红,王翁鸣. 特比萘芬片联合冰醋酸治疗甲真菌病 60 例临床疗效观察 [J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(4): 242-243
- [4] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 中国人民解放军医疗机构制剂规范 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 144-145
- [5] 李新中,马虹英,袁寿涛,等. 冰醋酸涂剂稳定性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(5): 279-280
- [6] 刘珊珊. 现行医院制剂质量标准有待完善 [J]. 中国药品标准, 2005, 6(5): 58-61

(收稿日期: 2011-06-05; 修回日期: 2011-07-28)

(本文编辑 梁爱君)

(上接 536 页)



A: 碱破坏; B: 氧化破坏; C: 酸破坏; 1: 福莫司汀

图 2 注射用福莫司汀破坏性试验 HPLC 图

4 讨论

4.1 检测波长的选择 按照文献 [4] 紫外-分光光

度法,在 200 ~ 400 nm 范围内扫描,福莫司汀在 202 nm 处有最大吸收,但 202 nm 作为检测的吸收波长时由于紫外末端仪器稳定性差,在选用 230 nm 波长测定,符合主药和中间体检测灵敏度要求,故选择 230 nm 处作为本品含量测定和有关物质测定的检测波长。

4.2 流动相的选择 本文曾尝试用乙腈-水 (20: 80) 作为流动相,但主峰峰形较差,与杂质峰的分离度小于 1.5。也尝试用甲醇-0.2% 磷酸二氢铵溶液的其他不同比例 (80: 20)、(70: 30)、(40: 60) 作为流动相,结果都不及甲醇-0.2% 磷酸二氢铵 (2: 1.5, V/V) 好。

参考文献

- [1] Sorensen-Jens-Benn. New cytostatic drugs in the treatment of non-small cell lung cancer Expert Opin [J]. Invest. Drugs, 1995, 4(12): 1281-1292
- [2] 张 敏,王京燕,纪晓光,等. 抗肿瘤药物福莫司汀粉针剂的安全性 [J]. 肿瘤研究与临床, 2006, 18(3): 156-157
- [3] 潘 波. 福莫司汀的合成及其无菌粉的制备 [J]. 上海医药, 2006, 27(7): 316-317
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010. 附录 IV A; V A

(收稿日期: 2010-08-31; 修回日期: 2011-03-14)

(本文编辑 金杨红)