

HPLC法测定羟喜树碱注射液中有关系物质

娄志红, 孙煌, 姜连阁, 白政忠

(黑龙江省药品检验所, 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 建立羟喜树碱注射液中有关系物质的 HPLC 检测方法。方法: 色谱柱为 VenusiMP- C_{18} (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 流动相为甲醇 - pH 2.5 甲酸溶液 (50:50); 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长为 254 nm。结果: 羟喜树碱的检测限为 2.7 ng。结论: 该方法专属性好, 简捷、快速, 能有效检出羟喜树碱注射液中的有关物质。

关键词 羟喜树碱注射液; 高效液相色谱; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0483-04

HPLC determination of related substances in hydroxycamptothecine injection

LOU Zhi-hong SUN Huang JIANG Lian-ge BAI Zheng-zhong

(Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150001, China)

Abstract Objectives To establish an HPLC method for determination of related substances in hydroxycamptothecine injection. **Method** The VenusiMP- C_{18} column (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm) was used. The mobile phase consisted of methanol - pH 2.5 formic acid solution (50:50). The flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. The detection wavelength was 254 nm. **Results** The limit of detection was 2.7 ng. **Conclusion** A specific, simple, rapid and suitable method is established for determination of related substances in hydroxycamptothecine injection.

Key words hydroxycamptothecine injection; HPLC; related substances

羟喜树碱注射液为喜树碱的羟基衍生物, 较喜树碱剂量小、毒性轻、抗癌谱广。通过抑制拓扑异构酶 I 而发挥细胞毒作用, 使 DNA 不能复制, 造成不可逆的 DNA 链破坏, 从而导致细胞死亡。用于原发性肝癌、胃癌、头颈部癌、膀胱癌及直肠癌。国家药品标准第三册收载的“羟基喜树碱注射液”质量标准对有关物质尚未加以控制。本文参考相关文献^[1-4], 在大量试验的基础上, 建立了羟喜树碱注射液有关物质检查的 HPLC 法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 液相: 岛津 LC-10A vp 液相色谱泵, SPD-10A vp 二极管阵列检测器, DGU-12A 在线脱气机, SCL-10A vp 系统控制器, SIL-10ADVP 自动进样器, CTO-10ACVP 柱温箱。TSQ 液质型质谱联用仪, 配有 ESI 离子源及 Xcaliber 数据处理系统, 具有软电离和二级质谱功能 (美国 Finnigan 公司); Agilent 1100 HPLC (美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂 羟喜树碱对照品为中国药品生物制品

检定所提供, 批号为 100526-200301。喜树碱对照品为中国药品生物制品检定所提供, 批号为 100532-200401。羟喜树碱注射液为 A 厂提供, 规格为 5 mL: 5 mg, 批号为 05077901, 05077902, 05077903。甲醇、甲酸均为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 液相: 色谱柱为 VenusiMP- C_{18} (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 流动相为甲醇 - pH 2.5 甲酸溶液 (50:50); 流速为 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 进样量 20 μ L。液质联用: 流动相为甲醇 - pH 2.5 甲酸溶液 (40:60); 色谱柱为 Agilent C_{18} (4.6 μ m, 2.1 mm \times 150 mm); 流速为 0.25 mL \cdot min⁻¹; 离子源为 ESI 源; 电压为 4 kV; 壳气 (N_2) 流速为 8.33 L \cdot min⁻¹; 辅助气 (N_2) 流速 1.66 L \cdot min⁻¹; 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C。

2.2 供试品溶液的制备 取本品, 用流动相稀释成每 1 mL 中含羟喜树碱 100 μ g 的溶液, 室温避光放置 2 h 使其环合成酯, 摇匀, 即得。

2.3 对照溶液的制备 精密量取供试品溶液 2 mL,

置 100 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 喜树碱对照品溶液的制备 取喜树碱对照品适量, 加甲醇溶解并稀释成每 1 mL 中含喜树碱 1 μg 的溶液, 即得。

2.5 检测限的测定 取羟喜树碱对照品, 精密称定, 用甲醇溶解并制成 134.75 ng·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀。精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。此时峰高约为基线噪音的 3 倍 (S/N 约为 3), 据此计算本品检测限为 2.7 ng。

2.6 空白试验 取本品辅料适量, 用流动相制成阴性空白溶液, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。结果表明辅料对有关物质检查无干扰。

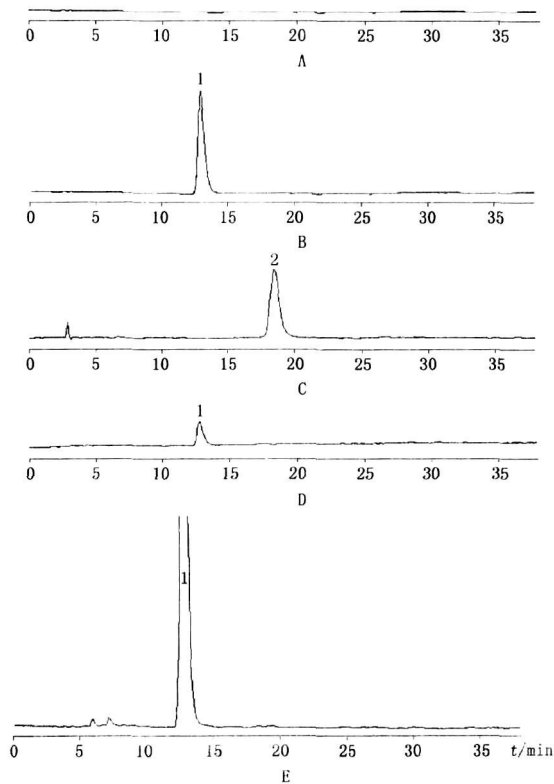


图 1 有关物质测定色谱图

Fig 1 Chromatograms of the related substances

A. 阴性样品 (negative sample) B. 羟喜树碱对照品 (hydroxycamptothecin reference substance) C. 喜树碱对照品 (camptothecin reference substance) D. 对照溶液 (2% of the test solution) E. 供试品溶液 (the test solution)

1 羟喜树碱 (hydroxycamptothecin) 2 喜树碱 (camptothecin)

2.7 专属性试验 取本品, 分别置 100 °C 水浴、强酸、强碱、4500 LX 光照和氧化条件下进行加速破坏。精密量取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 放置 2 h, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 2。结果表明光照条件下有关物质含量为 19.0%, 所以本品见光易分解, 需避光操作; 其他破坏条件各有关物质含量也有所增加, 其降解产物峰与主

成分峰均能达到较好的分离。另外, 采用二极管阵列检测器对羟喜树碱峰的起点、最大点、终点 3 个时间点进行扫描, 3 个时间点的色谱行为完全相同, 说明所选色谱条件测得的羟喜树碱峰为单组分峰, 结果表明该色谱条件能满足本品有关物质检查的要求。

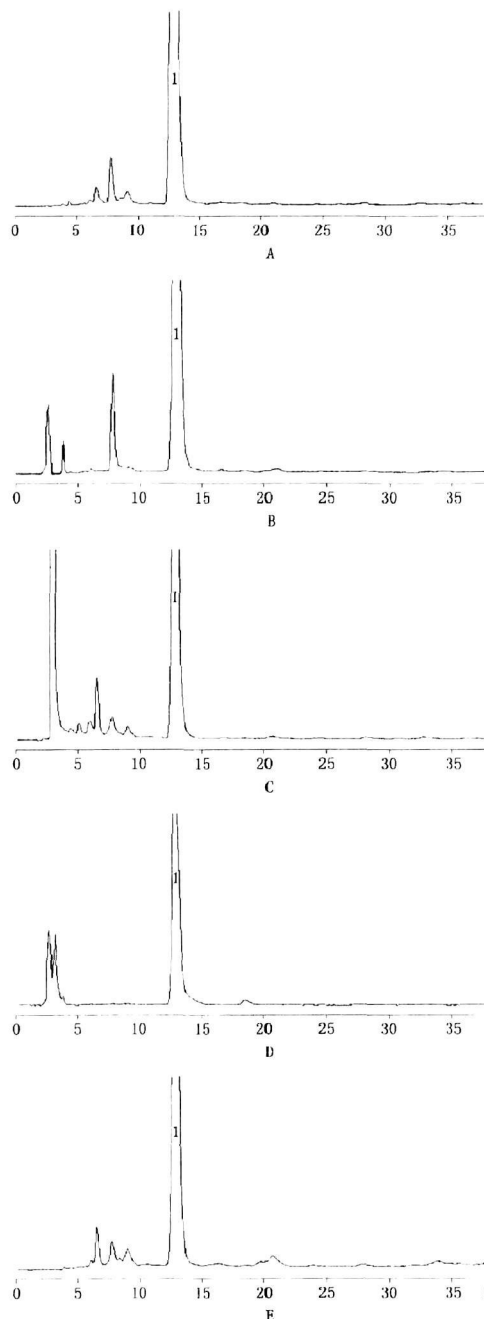


图 2 破坏性试验色谱图

Fig 2 Chromatograms of destroyed test

A. 加热破坏 (destroyed by heat) B. 碱破坏 (destroyed by alkali) C. 氧化破坏 (destroyed by oxygen) D. 酸破坏 (destroyed by acid) E. 光照破坏 (destroyed by light)

1. 羟喜树碱 (hydroxycamptothecin)

2.8 环合时间的确定 取新配制的供试品溶液,于室温避光放置 3 h 分别于 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h 取样依法测定,结果表明随放置时间的增加,盐型峰面积逐渐减小,内酯型峰面积逐渐增加,放置 2 h 样品已完全由盐型转化为内酯型。

2.9 溶液稳定性考察 取环合成酯的供试品溶液,于室温下放置 8 h 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 取样依法测定峰面积, RSD 为 0.87%。结果表明,室温放置 8 h 峰面积未发生显著变化。

2.10 样品有关物质检查 取对照溶液 20 μ L,注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的 10% ~ 20%;再精密量取喜树碱对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍。有关物质检查和相似度分析结果见表 1,表 2。

表 1 有关物质检测结果

Tab 1 Result of related substance

批号 (Lot No.)	喜树碱含量 % (content of camptothecin)	其他有关物质总和 % (The sum of other related substances)
05077901	0.11	3.86
05077902	未检出 (no detected)	3.19
05077903	未检出 (no detected)	4.08

表 2 DAD 相似度测定结果

Tab 2 Result of DAD similarity

批号 (Lot No.)	05077901	05077902	05077903
与羟喜树碱对照品相似度 (similarity to hydroxycamptothecin)	0.999954	0.999960	0.999957

2.11 液质联用杂质分析 采用全扫描一级质谱及选择离子全扫描二级质谱 (full scan MS²) 2 种方式进行测定,见图 3。3 号峰为羟喜树碱主峰,根据全扫描一级质谱图及全扫描二级质谱图推断 1 号峰 m/z 为 496.02 为非羟喜树碱同系物;2 号峰 m/z 为 397.00 为羟喜树碱同系物;4 号峰 m/z 为 349.03 结合喜树碱对照品质谱图,确定该杂质为喜树碱。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 二极管阵列检测器扫描结果表明羟喜树碱最大吸收为 266 nm,喜树碱最大吸收为 254 nm,3 批样品检测结果也表明,在 254 nm 波长处测定有关物质含量高于 266 nm。另外已有羟喜树碱质量标准 (WS₁-XG-0142001) 中有关物质检测波长为 254 nm。由于羟喜树碱较喜树碱剂量小、毒性轻、抗癌谱广,所以需控制喜树碱含量,选择检测波长 254 nm,即喜树碱最大吸收波长。

3.2 流动相的选择及羟喜树碱由盐向内酯转换条件的研究 羟喜树碱含一内酯结构,由于其不溶于水,在羟喜树碱注射液的制备工艺中需用氢氧化钠调节 pH 值使其内酯环开环成钠盐后溶于水,所以在有关物质含量测定时需在酸性条件下避光放置一段时间使其由钠盐形式全部转化为与对照品一致的内酯形式。本试验采用甲醇-水 (40:60) 及乙腈-水 (40:60) 为流动相,以稀醋酸配制供试品溶液进行转化时,溶剂峰对有关物质检测干扰较大,所以考虑用酸性较强的流动相。经多次试验,以甲醇-pH 2.5 甲酸溶液 (50:50) 为流动相,用流动相配制供试品溶液,避光放置 2 h 样品已完全由盐型转化为内酯型。之所以选择甲酸,是因为甲酸酸性较强,可以使本品由钠盐形式完全转化为内酯形式,另外考虑本流动相系统可以进行液-质联用分析。

3.3 洗脱条件和运行时间的确定 用梯度洗脱进行试验,热破坏样品在主成分峰 3 倍保留时间后还有杂质峰,但本品未经破坏的效期内样品在主成分峰 3 倍保留时间后已无其他色谱峰,所以建议采用等梯度洗脱条件,供试品溶液记录至主成分峰保留时间的 3 倍。

3.4 有关物质限度的确定 质谱分析结果表明,1 号峰为非羟喜树碱同系物,2 号峰和 4 号峰为羟喜树碱同系物。本品长期留样样品已放置 2 年,其有关物质检验结果均小于 5.0%,根据本品长期留样样品有关物质检测结果,初步拟定有关物质检查限度为:供试品溶液的色谱图中,与对照品溶液相应的

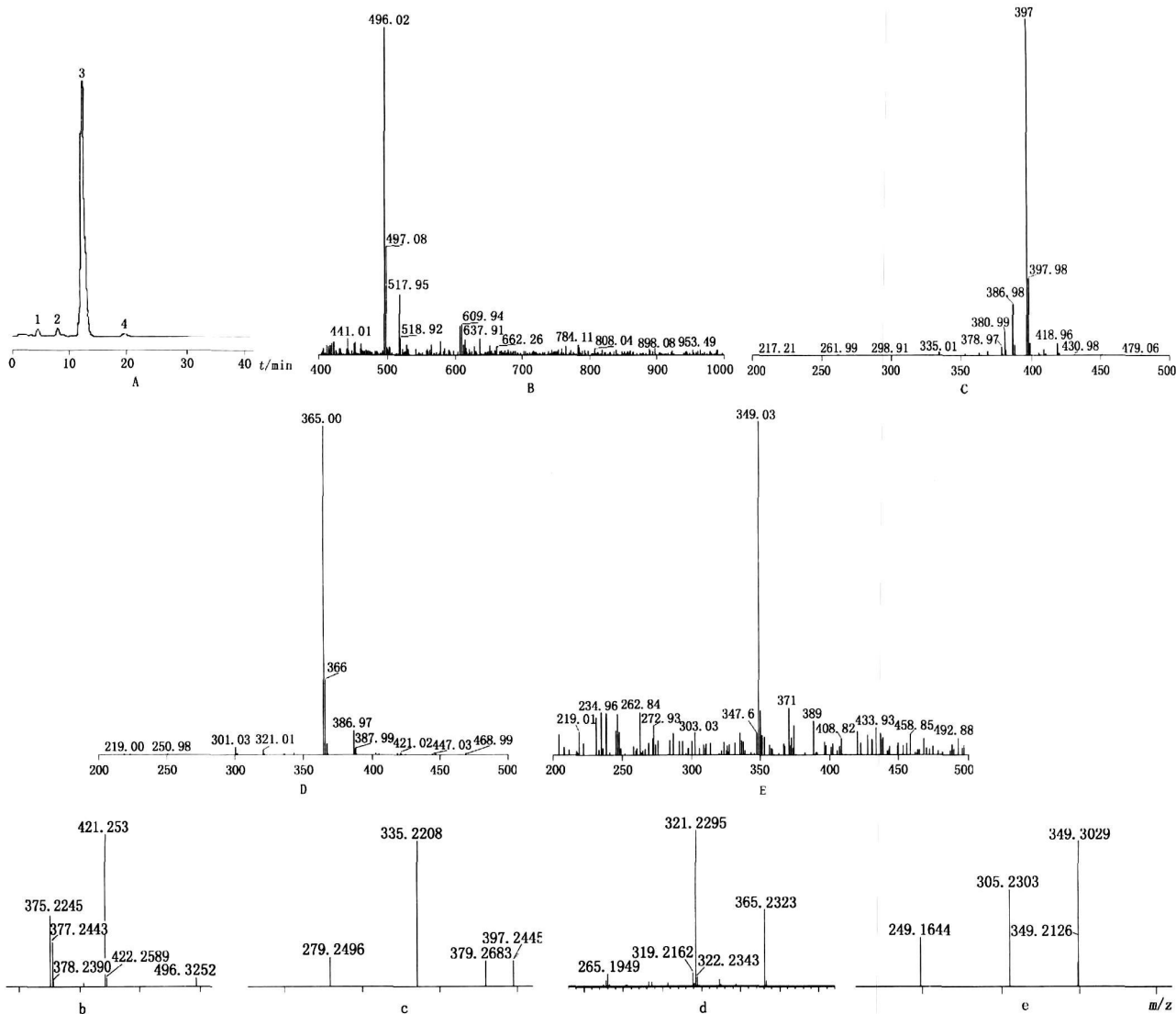


图 3 质谱分析图

Fig 3 Figure of mass spectographic analysis
A. 色谱图 (Chromatograms) B, C, D, E 分别为 1 号峰、2 号峰、3 号峰、4 号峰全扫描一级质谱图 (B, C, D, E is first ion mass spectrometry of peak 1, 2, 3, 4 respectively) a, b, c, d 分别为 1 号峰、2 号峰、3 号峰、4 号峰全扫描二级质谱图 (b, c, d, e is second ion mass spectrometry of peak 1, 2, 3, 4 respectively).

喜树碱峰面积不得大于对照品溶液峰面积 (1.0%), 其他各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主成分峰面积的 2.5 倍 (5.0%)。

参考文献

- 1 National Drug Standard vol 16(国家药品标准第十六册) WS₁-XG-014-2001
- 2 ZHANG Jing-jing (张晶晶), FANG Yun(方芸), TAN Heng-shang(谈恒山), *et al* Quantitative determination of two constituents form of 10-hydroxy-campothecin in human plasma and their mutual transformation (HPLC- 荧光法测定人血浆中羟基喜树碱的两种构型及其相互间的转化). *Jiangsu Pharm Clin Res*(江苏药学与

- 临床研究), 2005, 13(5): 7
- 3 ZHANG Hai-xin(张海霞), FANG Yun(方芸), TAN Heng-shang(谈恒山), *et al* Determination of concentration of hydroxycampothecin in rabbit plasma with HPLC-fluorimetric method (HPLC- 荧光法测定兔血浆中羟基喜树碱的浓度). *J Nanjing Univ Trad Chin Med* (南京中医药大学学报), 2006 22(1): 50
- 4 SONG Dan-qing(宋丹青), HU Chang-qin(胡昌勤), LAN Jing(兰静). Content and purities comparison of hydroxycampothecin injection and hydroxycampothecin for injection (羟基喜树碱注射液与注射用羟基喜树碱含量与有关物质的比较). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(9): 702

(本文于 2008 年 3 月 28 日收到)