

# HPLC法测定替加氟注射液中的氟尿嘧啶等有关物质

张伟, 江生, 罗立骏

(重庆市药品检验所, 重庆 401121)

**摘要** 目的: 采用反相高效液相色谱法测定替加氟注射液中的有关物质。方法: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以甲醇-乙腈-水(10:5:85)为流动相; 检测波长为 271 nm。结果: 替加氟与氟尿嘧啶能完全分离, 氟尿嘧啶检测限为 3.3 ng。结论: 本法简便, 专属性好, 结果准确, 可用于测定替加氟注射液的有关物质。

**关键词:** 替加氟注射液; 氟尿嘧啶; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0491-03

## HPLC determination of Fluorouracil and related substances in Tegafur Injection

ZHANG Wei, JIANG Sheng LUO Li jun

(Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China)

**Abstract Objective** A HPLC method was established for the determination of Fluorouracil and related substances in Tegafur Injection. **Method** The separation was performed on a ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of methanol-acetonitrile-water (10:5:85), the detection wavelength was 271 nm. **Result** Tegafur and Fluorouracil can be separated absolutely and the limit of detection of Fluorouracil was 3.3 ng. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and can be used for the determination of related substances in Tegafur Injection.

**Key words** Tegafur Injection; Fluorouracil; HPLC; related substances

替加氟为抗肿瘤药, 系在氟尿嘧啶的 1 位上连接了一个四氢呋喃而得, 其作用机理、疗效及抗癌谱与氟尿嘧啶相似, 与氟尿嘧啶相比作用持久, 吸收良好, 毒性较低。替加氟在生产和贮藏的过程中最有可能带入和产生的主要杂质为氟尿嘧啶。替加氟注射液质量标准收载于《中国药典》2005 年版二部<sup>[1]</sup>, 标准中有关物质检查项为 TLC 法, 经考察该法的灵敏度较低, 达不到有关物质检测的要求。因此建立了 HPLC 法测定替加氟注射液有关物质的方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (二极管阵列检测器)

替加氟注射液 (国内 6 个厂家提供), 氟尿嘧啶和替加氟对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 0187-9501 和 100468-200401), 超纯水, 乙腈 (色谱纯), 甲醇 (色谱纯)。

### 2 色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 和 phenomenex C<sub>18</sub> 4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇-乙腈-水 (10:5:85) 为流动相; 检测波长为 271 nm; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为室温; 进样量为 20 μL。

### 3 空白辅料干扰试验

按各生产厂家提供的处方配制空白辅料, 并按处方量制备空白溶液, 按上述色谱条件, 取滤液 20 μL 进样, 记录色谱图。结果见图 1, 结果表明空白辅料几乎不产生色谱峰, 对测定无影响。

### 4 检测波长的选择

代替加氟和氟尿嘧啶对照品适量, 用流动相溶解并稀释制成 20 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 照上述色谱条件, 用二极管阵列检测器扫描测定替加氟和氟尿嘧啶峰的紫外光谱图, 结果二者均在 271 nm 波长附近

有最大吸收, 因此采用 271 nm 作为测定波长。

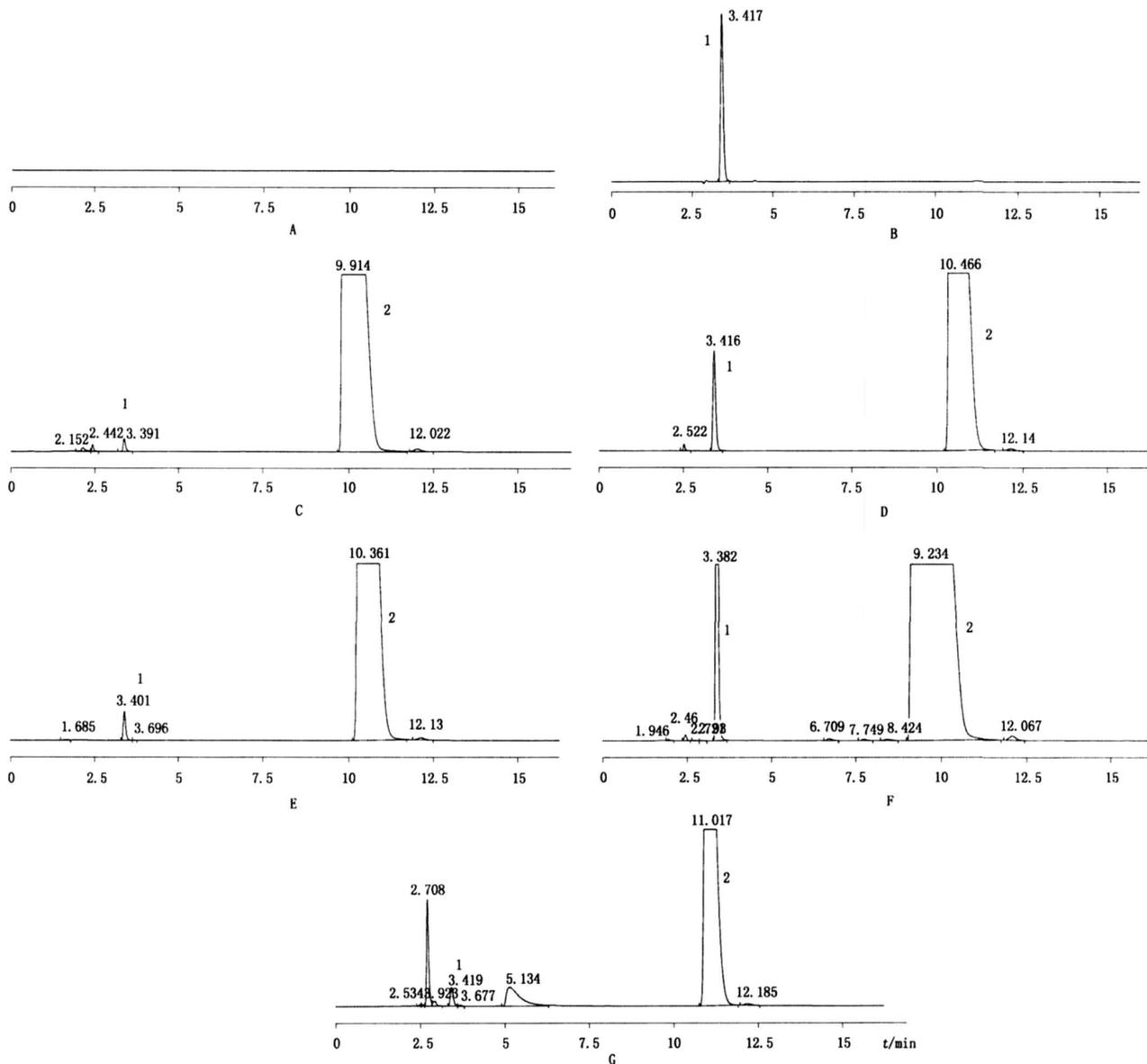


图 1 替加氟注射液破坏试验色谱图

Fig 1 Chromatograms of destroyed products separation

A. 空白辅料 (blank) B 氟尿嘧啶对照品 (Fluorouracil) C. 样品 (sample) D. 酸破坏 (destroyed by acid)  
 E. 光照破坏 (destroyed by light) F. 高温破坏 (destroyed by heat) G. 氧化破坏 (destroyed by oxidation)

1 氟尿嘧啶 (Fluorouracil) 2 替加氟 (Tegafur)

### 5 专属性考察

取本品 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加稀盐酸 3 mL, 放置过夜, 滴加  $1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  氢氧化钠中和, 加流动相稀释至刻度, 作为酸破坏溶液; 另取本品 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 3% 过氧化氢溶液 5 mL, 放置过夜, 加流动相稀释至刻度, 作为氧化破坏溶液; 另取本品 5 mL, 置 2000 k 光源下照射 8 h, 置 25 mL 的量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为光照破坏溶液; 另取本品 5 mL, 置 120 °C 的恒温箱中加热破坏 2 h,

置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为高温破坏溶液。

取上述 4 种溶液各 5 mL 置 200 μL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 取 20 μL 进样测定, 结果见图 1。

本品在酸、光照、高温、氧化破坏条件下均有不同程度的降解, 主要的降解产物均为氟尿嘧啶。对氟尿嘧啶峰和替加氟峰进行峰纯度检查, 结果均大于 99% 替加氟峰与降解产物峰能完全分离, 其分离度均大于 1.5, 说明本色谱条件能有效检测替加氟

注射液中的氟尿嘧啶和降解产物。

### 6 氟尿嘧啶和替加氟的线性关系考察

分别精密称取氟尿嘧啶和替加氟对照品约 10 mg 加流动相溶解并稀释制成 0.2 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 4.0 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 分别在“2”项色谱条件下测定, 记录色谱图, 测定色谱峰面积。以氟尿嘧啶和替加氟的峰面积 (Y), 分别对其浓度 (X) 进行线性回归, 得氟尿嘧啶和替加氟的回归方程分别为:

$$Y = 71.61X - 0.1085 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 55.65X - 3.8889 \quad r = 0.9999$$

结果表明氟尿嘧啶和替加氟浓度在 0.2~8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 7 氟尿嘧啶的回收率试验

取氟尿嘧啶对照品适量, 加流动相溶解并制成适宜浓度的对照品溶液, 精密量取一定体积 (相当于替加氟标示量的 0.5%, 1.0%, 1.5%) 加入按处方比例配制好的空白辅料中, 照“12 样品测定”的方法依法测定, 每一浓度测定 6 份样品。结果高中低 3 个浓度水平的回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 99.72% (RSD = 0.8%), 99.58% (RSD = 0.6%), 99.23% (RSD = 1.2%); 平均回收率 ( $n = 18$ ) 为 99.51%。

### 8 检测限和定量限

精密称取替加氟和氟尿嘧啶对照品适量, 加流动相定量稀释制成一定浓度的溶液, 取 2  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果测得替加氟的检测限为 0.33 ng 定量限为 1.1 ng 氟尿嘧啶的检测限为 0.09 ng 定量限为 0.3 ng

### 9 精密度试验

取供试品溶液, 连续进样 6 次, 氟尿嘧啶峰 RSD 为 0.31%; 总杂质峰面积的 RSD 为 0.51%, 表明本方法精密度良好。

### 10 重复性试验

取同一批号的替加氟注射液配制 6 份供试品溶液, 照“12 样品测定”的方法依法测定, 测得氟尿嘧啶的平均含量为 0.70%, RSD 为 0.83%; 总杂质为 0.73%, RSD 为 0.98%。

### 11 稳定性试验

取供试品溶液, 分别于 0 2 4 6 8 10 12 h 进样, 氟尿嘧啶峰 RSD 为 1.3%; 总杂质峰面积的 RSD 为 1.6%, 表明氟尿嘧啶和总杂质在 12 h 内无明显

变化, 供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

### 12 样品测定

取本品, 加流动相分别制成每 1 mL 中约含 0.2 mg 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为对照溶液; 另取氟尿嘧啶对照品 10 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 作为对照品溶液。照上述色谱条件, 取对照溶液 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10%, 再精密量取供试品溶液、对照溶液和对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。氟尿嘧啶以外标法计算, 其它杂质与对照溶液主峰面积比较, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab 1 The results of determination

| 生产厂<br>(factory) | 批号<br>(batch) | 氟尿嘧啶 %<br>(fluoruracil) | 总杂质 %<br>(total impurity) |
|------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| A                | 070502        | 0.70                    | 0.73                      |
| B                | 703002EU      | 0.24                    | 0.53                      |
|                  | 703007ET      | 0.23                    | 0.47                      |
| C                | 041223        | 2.71                    | 3.50                      |
|                  | 050731        | 2.14                    | 2.66                      |
|                  | 070211        | 1.26                    | 1.76                      |
| D                | 608201        | 0.30                    | 0.79                      |
| E                | 70107302      | 0.30                    | 0.99                      |
| F                | 20070102      | 0.29                    | 1.27                      |

### 13 讨论

13.1 替加氟注射液质量标准收载于《中国药典》2005 年版二部, 标准中有关物质检查法为 TLC 法, 经考察该法的灵敏度较低, 含量在 3% 以下的单个杂质不能检出斑点, 因此该法不能有效控制替加氟注射液的有关物质, 有必要采用灵敏度更高的方法来控制药品质量。

13.2 本文采用的色谱条件能有效分离替加氟、氟尿嘧啶和其它有关物质, 灵敏度高, 专属性好, 可用于替加氟注射液的有关物质检测。

### 参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. Vol II (二部): 681

(本文于 2008 年 1 月 28 日收到)