

高效液相色谱法测定注射用盐酸表阿霉素的含量

蔡美明 周帽雄 殷璐

(江苏省药品检验所, 南京 210008)

关键词 盐酸表阿霉素; 注射用盐酸表阿霉素; HPLC; 含量测定

表阿霉素(epirubicin)属第三代蒽环类抗肿瘤抗生素, 是阿霉素的同分异构体。它高效、广谱, 为同类药物之首选。注射用盐酸表阿霉素是以盐酸表阿霉素为主要药效成分, 加入适当辅料制成的无菌冻干制剂。有关其含量测定方法至今国内未见报道, 国外报道有分光光度法和梯度高效液相色谱法(法玛西亚公司内部资料)、微生物效价测定法^[1]、高效液相色谱法(内标法)^[1]。由于不同产品其生产处方和所用辅料各不相同, 即将批准生产的国产盐酸表阿霉素冻干制剂是以乳糖和对羟基苯甲酸甲酯为辅料的, 为了制定该制剂含量测定的质量标准, 有效地控制产品的质量, 我们参考有关的资料对含量测定方法进行研究, 并用不同方法考察制剂稳定性。实验证明本文所采用的HPLC法(外标法)快速、简便, 准确度高, 回收率好, 专属性强。而分光光度法、微生物效价测定法专属性差, 内标法中内标物质在国内又难以获得。

1 实验部分

1.1 试药与仪器

盐酸表阿霉素对照品(94.4%, 意大利 Farmitalia Carlo Erba S. P. A. 提供); 注射用盐酸表阿霉素(法玛西亚亚洲有限公司提供, 规格 10 mg, 内含辅料乳糖、对羟基苯甲酸甲酯); 盐酸阿霉素对照品(上海华联制药

公司); 乙腈(色谱纯); 85% 磷酸; 超纯水

Sp 8815高效液相色谱仪; Sp 100可变波长检测器; Sp 4270积分仪; 定量进样器(10 μ l, USA); Waters μ Bondapak TM C₁₈柱(3.9 mm×300 mm, 10 μ m)。

1.2 方法和结果

1.2.1 色谱条件 柱温: 室温; 以水-乙腈(68:32)并用 85% 磷酸调节 pH 值至 2.4 的溶液为流动相; 检测波长 254 nm; 流速 1 ml/min; 定量进样 10 μ l。

取盐酸表阿霉素对照品和盐酸阿霉素对照品, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制成浓度为 0.25 mg/ml 的溶液; 取辅料乳糖和对羟基苯甲酸甲酯适量, 精密称定, 加流动相溶解并稀释制成约 1.25 mg/ml 与 0.05 mg/ml(相当于盐酸表阿霉素 0.25 mg/ml 时的处方量)的溶液。按上述色谱条件进样测定, 色谱图见图 1。色谱柱的理论板数以盐酸表阿霉素计算大于 3000, 盐酸表阿霉素峰与盐酸阿霉素峰、对羟基苯甲酸甲酯峰之间的分离度分别大于 1.5 和 2.0, 其中乳糖无峰信号。

1.2.2 标准曲线制备 取盐酸表阿霉素对照品约 50 mg, 精密称定, 加流动相精密制成浓度为 0.00, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mg/ml 的对照品溶液, 按色谱条件项下进样测定, 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标作标准曲线, 得线性回归方程为 $A =$

6. 92 \times 10⁴ 3. 095 \times 10⁶ C, r= 0. 9999

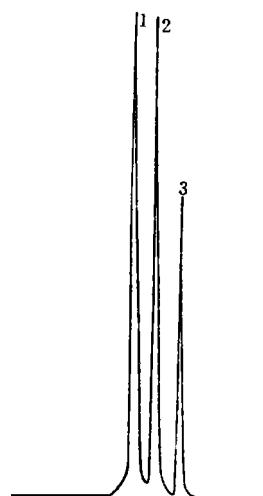


Fig 1. Chromatogram

1. doxorubicin hydrochloride (6. 26 min); 2. epirubicin hydrochloride (7. 41 min); 3. methyl p-hydroxybenzoate (8. 65 min)

1. 2. 3 回收率测定 精密称取盐酸表阿霉素若干份,每份按处方量加入辅料乳糖,对羟基苯甲酸甲酯混合均匀,用流动相溶解后,按上述操作测定峰面积;另取盐酸表阿霉素对照品同法测定峰面积后,照外标法计算,求出每份回收率,结果见表 1

Tab 1. Recovery of epirubicin hydrochloride

| Added mg | Found mg | Recovery % | \bar{x} % | RSD % |
|----------|----------|------------|-------------|-------|
| 34. 05 | 33. 99 | 99. 82 | 100. 6 | 1. 1 |
| 37. 32 | 37. 98 | 101. 8 | | |
| 25. 82 | 26. 20 | 101. 5 | | |
| 26. 02 | 26. 10 | 100. 3 | | |
| 34. 65 | 35. 07 | 101. 2 | | |
| 37. 00 | 36. 60 | 98. 92 | | |

1. 2. 4 重现性测定 取注射用盐酸表阿霉素样品适量,按上述色谱条件分别进行日内和日间重现性试验,采用“回收率测定”项下外标法计算结果,得日内 RSD 为 0. 9% (n=5),日间 RSD 1. 1% (n= 8)

1. 2. 5 样品测定 取样品适量,精密称定,加流动相溶液并定量稀释制成浓度为 0. 25 mg /ml的溶液,精密取 10⁴ l进样测定,计算峰面积;另取对照品同法测定,重复进样五次(其相对标准差 RSD 小于 2. 0%),按外标

法计算含量,结果见表 2

Tab 2. Assay of sample (n= 3)

| No. | Epirubicin hydrochloride the labeled amount % | RSD % |
|-----|---|-------|
| 1 | 98. 2 | 0. 8 |
| 2 | 106. 7 | 0. 7 |
| 3 | 107. 4 | 0. 9 |
| 4 | 111. 2 | 0. 9 |
| 5 | 109. 8 | 1. 2 |
| 6 | 104. 8 | 0. 1 |

1. 2. 6 稳定性试验 取冻干制剂样品分别置 40, 60, 80°C 放置 1, 3, 5, 10 d, 然后以上述外标法测定其盐酸表阿霉素的含量, 以归一化法计算有关物质(包括降解产物)的含量, 结果见图 2 和表 3, 由表 3 可见制剂于 60°C 10 d, 于 80°C 3 d 始含量下降, 其余条件下均稳定, 故制剂应于低温处贮存。

Tab 3. Stability test result of epirubicin hydrochloride injection

| Temp. °C | The labeled amount % | | | | The labeled amount % | | | | | |
|----------|----------------------|-------|-------|-------|----------------------|------|------|------|------|------|
| | 0d | 1d | 3d | 5d | 10d | 0d | 1d | 3d | 5d | 10d |
| 40 | 98. 2 | 98. 4 | 98. 4 | 98. 0 | 96. 8 | 2. 0 | 2. 1 | 2. 1 | 2. 0 | 1. 6 |
| 60 | 98. 2 | 97. 6 | 98. 7 | 96. 0 | 94. 2 | 2. 0 | 2. 0 | 2. 0 | 1. 9 | 2. 1 |
| 80 | 98. 2 | 99. 2 | 92. 9 | 89. 9 | 84. 9 | 2. 0 | 2. 5 | 2. 1 | 4. 0 | 7. 5 |

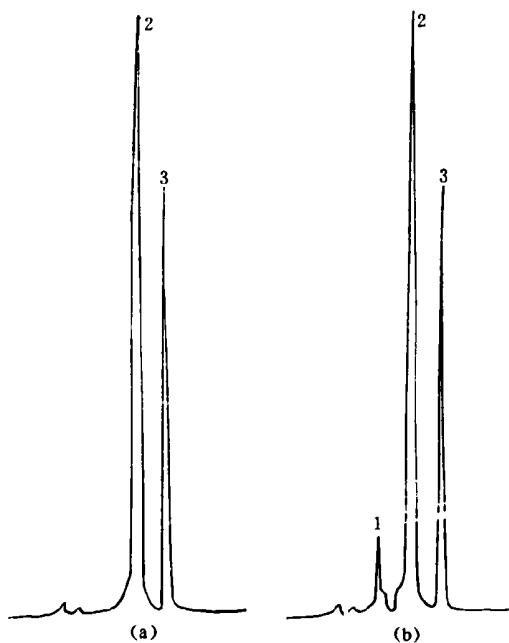


Fig 2. Chromatogram of the stability test
(a) 0 d; (b) 10 d under 80°C; (1) degraded compound (4. 72 min); (2) epirubicin hydrochloride (7. 41 min); (3) methyl p-hydroxybenzoate (8. 67 min)

2 讨 论

1)由于目前已广泛用定量进样器,使外标法原有的缺点得以克服。采用外标法可克服难以获得内标物的困难,能减少因加入内标溶液时操作带进的误差,使操作简便。重现性好,回收率高。另外目前 USP 23 版和 BP 1993 年版收载的盐酸表阿霉素同类产品盐酸柔红霉素和盐酸阿霉素其含量测定均采用外标法,所以本文采用 HPLC 外标法进行测定。

2)由于样品中有辅料对羟基苯甲酸甲酯存在,如按参考文献^[1]所采用的流动相比例水-乙腈(69:31),此辅料峰的 t_R 为 5.09,这将对含量测定产生干扰(降解产物峰 t_R 4.72,盐酸阿霉素峰 t_R 6.26,盐酸表阿霉素峰 t_R 7.42),适当增加流动相乙腈的量至水-乙腈(68:32),使辅料峰 t_R 达 8.65,继续增加乙腈量对提高分离度不再有效。其中调节乙腈量对盐酸表阿霉素与其它峰的分离无影响。

3)盐酸表阿霉素与盐酸阿霉素的分离度主要受柱效和流动相的 pH 值影响。曾用理论板数小于 1000 的 Waters C₁₈ 柱测定上述两物质混合物,结果在 t_R 7.08 处得一个峰。同时这两峰的分离度受流动相 pH 值的影响,文献^[1]采用 pH 2,我们实验结果表明流动相在 pH 2.3~2.5 范围内,上述两峰有良好分离。所用国产柱子对此酸性条件的耐受性较差,甚至 t_R 不重现而无法确定各成分。考虑到柱子的保护我们未对低于 pH 2.3 的条件进行试验。

4)曾用分光光度法和微生物效价测定法对放置 0 d 与 80°C 10 d 的样品分别进行含量测定。分光光度法测定结果,两者含量几乎相等。微生物效价测定结果,两者含量的差异只在方法误差所允许的 3.0% 范围之内。而采用本文方法测定结果,两者含量有明显差异。

参 考 文 献

1 日本抗生物质医药品基准, 1990. 10~105

Assay of Epirubicin Hydrochloride for Injection and Its Stability Study by HPLC

Cai Meiming, Zhou Guoxiong, Ying Lu

Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008

Abstract An analytical method of HPLC has been developed to assay epirubicin hydrochloride for injection (the contained methyl-*p*-hydroxybenzoate) and its stability result. HPLC was performed on the Waters^μ BondapakTM C₁₈ column (3.9 mm × 300 mm, 10^μ m) with mobile phase of water-acetonitrile (68:32) (adjusted to pH 2.4 with 8% phosphoric acid) at 254 nm of detection wavelength. The average recovery was 100.6% ± 1.1%. The RSD of intraday and interday was 0.9% and 1.1% respectively. The standard curve was linear over the concentration range of 0.00~0.35 mg/ml ($r=0.9999$)

Key words Epirubicin hydrochloride; Epirubicin hydrochloride for injection; HPLC; Assay