

# HPLC 同时测定羟喜树碱注射液的有关物质及含量

彭茗, 陆丹, 刘瑾, 杨永健(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要:** 目的 建立以高效液相色谱法同时测定羟喜树碱注射液的有关物质和含量的方法。方法 采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(60 : 40), 检测波长为 370 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C。结果 有关物质: 羟喜树碱与杂质分离度良好, 羟喜树碱和其杂质喜树碱的线性范围均在 0.2~1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 之间, 相关系数均在 0.999 7 以上, 最低检测限分别为 0.2 ng 和 0.3 ng。含量测定: 羟喜树碱在 4.0~36.3 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性相关系数为 1.000 0, 根据 3 个不同生产厂家的处方工艺分别进行低、中、高 3 种浓度的回收率试验, 结果均在 100.0%~102.0% 之间, RSD 均在 0.02%~0.71% 之间( $n=3$ )。结论 本方法专属性强、准确性高, 可全面系统地控制羟喜树碱注射液的质量。

**关键词:** 高效液相色谱法; 羟喜树碱注射液; 喜树碱; 有关物质; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)09-0866-05

## Simultaneous Determination for Related Substances and Content of Hydroxycamptothecin Injection by HPLC

PENG Ming, LU Dan, LIU Jin, YANG Yongjian(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for simultaneous determination of related substances and content of hydroxycamptothecin injection. **METHODS** The chromatographic column was Ultimate XB-C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of a mixture of methanol-water(60 : 40). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 370 nm. The column temperature was maintained at 35 °C. **RESULTS** For the determination of related substances: the separations between hydroxycamptothecin and its related substances were very well. The calibration curves of hydroxycamptothecin and its main related substance, namely camptothecin, were both linear within the ranges of 0.2~1.0 μg·mL<sup>-1</sup>( $r \geq 0.999 7$ ), and the LODs were 0.2 ng and 0.3 ng, respectively. For the determination of content: hydroxycamptothecin was linear within the range of 4.0~36.3 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=1.000 0$ ), the average recoveries of low, medium and high concentrations based on the formulations from manufactory A, B and C were between 100.0% and 102.0%, the RSDs were between 0.02% and 0.71%( $n=3$ ). **CONCLUSION** The method is specific and accurate, and can systematically be used for the quality control of hydroxycamptothecin injection.

**KEY WORDS:** HPLC; hydroxycamptothecin injection; camptothecin; related substances; content determination

羟喜树碱(10-hydroxycamptothecin, HCPT)系从我国内地特有的珙桐科植物(*Nyssaceae*)喜树(*Camptotheca acuminata*)中提取得到的生物碱类抗癌药物<sup>[1]</sup>, 对胃癌、肝癌、白血病及头颈部肿瘤等

疾病有显著疗效<sup>[2]</sup>。HPTC 系 DNA 拓扑异构酶 I(DNA topoisomerase I)抑制剂, 为细胞特异性药物, 主要作用于细胞合成期<sup>[3]</sup>。研究表明 HPTC 比喜树碱的疗效高且毒性低<sup>[1]</sup>。

作者简介: 彭茗, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 13611619742

E-mail: ming0519@hotmail.com

目前国内 HPTC 的主要剂型为注射液和注射用粉针,其中以注射液的生产厂家居多。目前 HPTC 注射液有两个国家标准<sup>[4-5]</sup>,其中仅一个标准<sup>[5]</sup>制定了 HPLC 检查有关物质的方法,而各国药典均未收录本品种。近年来,国内对 HPTC 注射液质量研究的文献<sup>[6-7]</sup>未对有关物质或含量测定两者相结合进行综合研究和分析。本试验建立的 HPLC 方法可同时测定 HPTC 注射液的有关物质和含量,分别对 3 个不同生产厂家的 9 批样品进行测定,并对含量测定的结果与按国家标准的方法测得的含量结果进行了比较。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(包括自动进样器、二极管阵列检测器和 ChemStation 数据处理系统,美国 Agilent 公司);HPTC 注射液共 9 个批次(批号分别为 A 厂:070301;B 厂:20070116,20070206;C 厂:20060102,20060820,20070525,20060103,20060418,20060711);HPTC 对照品(中国药品生物制品检定所标定,批号:100526-200301,纯度:100.0%);喜树碱对照品(中国药品生物制品检定所标定,批号:100532-200401,纯度:100.0%);甲醇为色谱纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 有关物质测定

**2.1.1 色谱条件** HPTC 注射液的有关物质及含量测定均采用同一液相色谱系统。色谱柱:Ultimate XB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(60:40);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:370 nm;柱温 35℃;进样量:20 μL。

**2.1.2 线性试验** 精密称取 HPTC 对照品和喜树碱对照品各 10 mg 置同一 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,精密量取 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇 10 mL,用水稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液。精密量取 1,2,3,4 和 5 mL,分别置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,分别进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标,进样浓度(X)为横坐标,分别进行线性回归。结果 HPTC 在 0.2016~1.008 μg·mL<sup>-1</sup> 的浓度范围内线性良好,回归方程为  $Y=78.786X+0.2278$ ,  $r=0.9997$ ;喜树碱在 0.2032~1.016 μg·mL<sup>-1</sup> 的浓度内线性良好,回归方程为  $Y=73.734X-0.1045$ ,  $r=0.9998$ 。

**2.1.3 定量限和检测限** 取“2.1.2”项下的最低浓度溶液逐步稀释,按信噪比(S/N)为 10 得到

HPTC 和喜树碱的定量限分别为 0.7 ng 和 1.0 ng;按信噪比(S/N)为 3 得到最低检测限分别为 0.2 ng 和 0.3 ng。

**2.1.4 破坏试验** 精密量取本品(批号:070301)1 mL,分别置 5 个 50 mL 量瓶中,分别进行高温(105℃加热 8 h)、光照(254 nm 紫外光灯下照射 2 h)、酸(加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液 1 mL,于 60℃放置 2 h)、碱(加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液 1 mL,于 60℃放置 2 h)和氧化(加 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 1 mL,于 60℃放置 2 h)破坏试验后,再各加入稀醋酸 2 mL,并用流动相稀释至刻度,于室温下避光放置 3 h,摇匀,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定。同时对空白辅料作相应的破坏处理。结果在各个破坏条件下,样品溶液中产生的杂质峰均与主峰分离良好;HPTC 主峰的色谱纯度均在 99.84%和 100.00%之间;本色谱系统满足有关物质检查的系统适用性要求。

**2.1.5 仪器精密度试验** 取“2.1.2”项下分别含 HPTC 和喜树碱各 0.6 和 1.0 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液各 20 μL,分别连续进样 3 次,以浓度除以峰面积得到的校正因子计算进样精密度,结果 HPTC 校正因子 RSD=0.8%(n=6),喜树碱校正因子 RSD=1.0%(n=6)。

**2.1.6 稳定性试验** 精密量取本品(批号分别为 20060820,070301)各 1 mL,分别置 50 mL 量瓶中,加稀醋酸 2 mL,再加流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取 20 μL,分别在 0,0.5,1.5,2.5,3.5,4,5,6,7 和 8 h 时分别进样。结果在 0 h 时,由于开闭环反应未达到平衡,HPTC 闭环物主成分峰面积较小;在 2.5~8 h 之内,HPTC 闭环物主峰面积、喜树碱量和杂质总量基本保持稳定。

**2.1.7 样品测定** 在“2.1.1”项下色谱条件下,喜树碱和 HPTC 的校正因子比约为 1.07:1,两者非常接近,故可采用 HPTC 主成分自身对照法进行有关物质结果的计算。精密量取本品 2 mL,置 100 mL(规格:1 mg·mL<sup>-1</sup>)或 200 mL(规格:2 mg·mL<sup>-1</sup>)量瓶中,加稀醋酸 2 mL,再加流动相稀释至刻度,于室温下避光放置 3 h,摇匀,作为供试品溶液。精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液(1.0%)。分别精密量取 20 μL 注入液相色谱仪进行测定,并按自身对照法计算,3 个生产厂家共 9 批样品测定结果见表 1 和图 1。

表 1 HPTC 注射液有关物质测定结果

Tab 1 Results of related substances of hydroxycamptothecin injection

生产企业	批号	规格	喜树碱 /%	单个最大未知杂质/%	未知杂质总量/%	杂质总量/%
A 厂	070301	5 mL : 5 mg	0.3	0.2	0.7	1.1
B 厂	20070116	2 mL : 2 mg	1.3	0.6	2.0	3.3
B 厂	20070206	5 mL : 5 mg	0.7	0.5	2.0	2.7
C 厂	20060820	2 mL : 2 mg	3.5	3.3	12.3	15.8
C 厂	20070525	2 mL : 2 mg	2.9	4.0	18.0	20.9
C 厂	20060102	2 mL : 2 mg	2.5	10.2	18.9	21.3
C 厂	20060711	5 mL : 10 mg	0.3	7.2	13.1	13.4
C 厂	20060103	5 mL : 10 mg	2.8	8.1	15.8	18.6
C 厂	20060418	5 mL : 10 mg	0.4	6.5	11.7	12.1

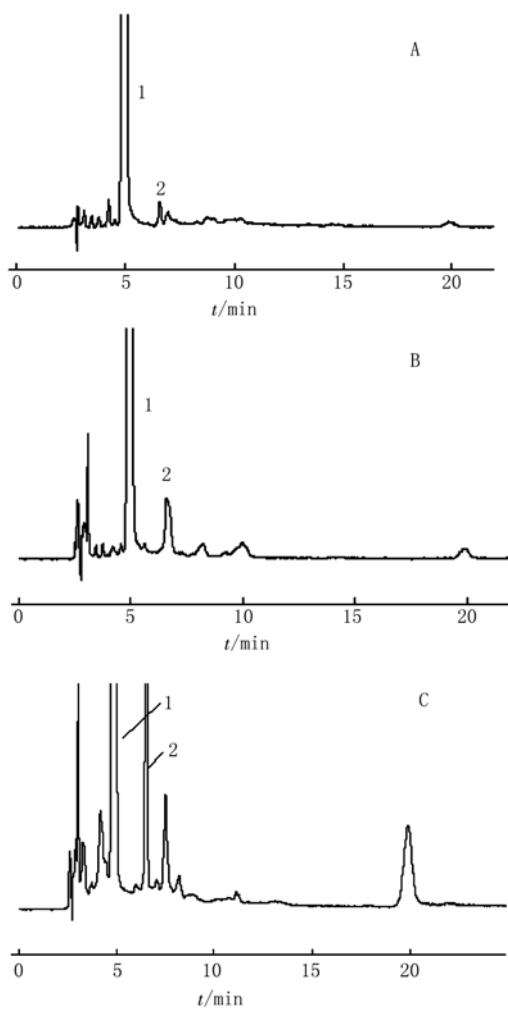


图 1 HPTC 注射液有关物质样品测定色谱图  
A-批号 070301(A 厂); B-批号 20070116(B 厂); C-批号 20060820(C 厂); 1-HPTC; 2-喜树碱

Fig 1 Related substances chromatograms of hydroxycamptothecin injections

A-Batch No. Lot 070301 (manufactory A); B-Batch No. 20070116 (manufactory B); C-Batch No. 20060820(manufactory C); 1-hydroxycamptothecin; 2-camptothecin

## 2.2 含量测定

2.2.1 专属性试验 取“2.1.2”项下的贮备溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$ , 结果在此色谱条件下, 理论板数按 HPTC 峰计算为 12 486, HPTC 峰和喜树碱峰的分 离度为 8.23, 结果见图 2。

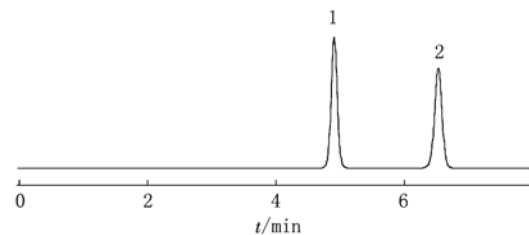


图 2 HPTC 注射液色谱图

1-HPTC; 2-喜树碱

Fig 2 Chromatogram of hydroxycamptothecin injection  
1-hydroxycamptothecin; 2-camptothecin

2.2.2 线性试验 精密称取 HPTC 对照品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备溶液。精密量取上述溶液 1, 2, 5, 7, 9 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 分别加入 甲醇 14, 13, 10, 8, 6 mL, 再加水稀释至刻度, 摇匀, 分别按色谱条件进样测定, 以峰面积(Y)为 纵坐标, 进样浓度(X)为横坐标, 进行线性回归。 结果 HPTC 在  $4.028\sim 36.252 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓度内线性 良好, 回归方程为  $Y=80.825X+1.4666$ ,  $r=1.0000$ 。

2.2.3 精密度试验 取“2.2.2”项下分别含 HPTC 8, 20 和  $28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 分别连续 进样 3 次, 以浓度除以峰面积得到的校正因子计算 进样精密度, 结果 HPTC 校正因子  $\text{RSD}=0.3\%(n=9)$ 。

2.2.4 回收率试验 精密量取线性试验项下的对 照品贮备溶液 4, 5 和 6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中,

分别加入处方量的辅料溶液 0.5 mL, 加流动相适量, 再加稀醋酸 1 mL, 用流动相稀释至刻度, 于室温下避光放置 3 h, 摇匀, 分别按色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果低、中、高 3 种浓度平均回收率( $n=3$ )分别为 A 厂: 100.0%, RSD=0.02%; 101.0%, RSD=0.15%; 101.3%, RSD=0.21%; B 厂: 100.8%, RSD=0.08%; 101.7%, RSD=0.71%; 102.0%, RSD=0.25%; C 厂: 101.1%, RSD=0.35%; 101.2%, RSD=0.11%; 101.3%, RSD=0.09%。3 个厂家的辅料对含量测定均无干扰。

**2.2.5 样品测定** 取“2.2.2”项下含 HPTC 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 并取“2.1.7”项下的供试品溶液, 照“2.1.1”项下色谱条件测定, 按外标法以峰面积计算含量; 另外参照国家标准<sup>[4-5]</sup>中的含量测定的方法, 采用紫外-可见分光光度法在 413 nm 波长处测定吸光度, 分别对本品按吸收系数法和对照品比较法计算含量。结果: 9 批样品用 UV 对照品比较法测得的含量均比 UV 吸收系数法约低 4%; A 厂和 B 厂样品的 UV 对照品比较法的结果与 HPLC 法的结果相当, 但 C 厂 6 批样品的 HPLC 结果均明显低于 UV 的结果, 且 HPLC 结果均不符合规定。结果见表 2。

**表 2** 样品含量测定结果与现行国家标准方法比较(含量限度: 85.0%~110.0%)

**Tab 2** Comparison of HPLC method with current national standards on the determination of sample contents (content limit: 85.0%-110.0%)

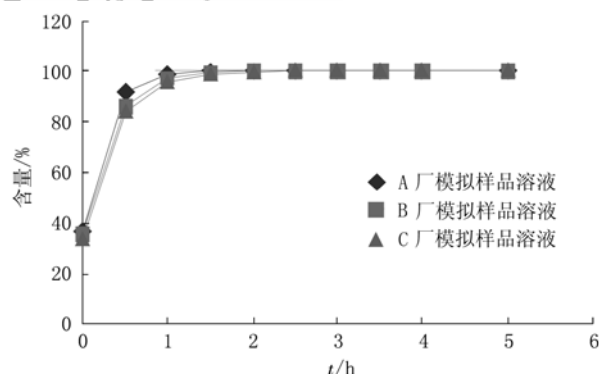
生产企业	批号	含量/% (HPLC 法)	含量/% (UV 吸收 系数法)	含量/% (UV 对照 品法)
A 厂	070301	90.7	95.2	91.6
B 厂	20070116	90.7	96.3	92.6
B 厂	20070206	96.7	100.5	96.7
C 厂	20060820	57.2	89.9	86.5
C 厂	20070525	52.7	94.8	91.3
C 厂	20060102	57.4	85.7	82.5
C 厂	20060711	75.4	97.5	93.9
C 厂	20060103	67.6	93.6	90.1
C 厂	20060418	74.3	96.6	92.9

### 3 讨论

HPTC 和其杂质喜树碱在流动相中均在 370 nm 左右有最大吸收, 吸收系数基本一致, 溶剂和辅料在 370 nm 波长处均无明显吸收, 故选择 370 nm 作为检测波长。为计算简便, 在有关物质计算时采用主成分自身对照法。

HPTC 为一内酯结构的化合物, 其注射液在制剂过程中加入碱使其酯键断裂, 生成易溶于水的羧酸盐型开环化合物。在配制供试品溶液的时候, 须加入稀醋酸使其酸化, 并放置一段时间, 使开环化合物重新闭环。据报道, HPTC 在酸性环境下 ( $\text{pH}<4$ ) 时, 闭环的内酯构型占主导地位<sup>[3]</sup>, 本试验所用溶剂的 pH 值约为 3.4。

为考察 HPTC 开环化合物的闭环时间, 取 HPTC 对照品参照 A、B 和 C 厂的处方配制成模拟样品溶液, 由于处方中均采用氢氧化钠调节 pH 至碱性, 故模拟样品溶液中的 HPTC 对照品均为开环。参照含量测定的方法, 配制不同处方的供试品溶液, 并测定加稀醋酸后不同放置时间下供试品溶液中 HPTC(闭环物)的含量, 结果发现 0 h 时的含量均仅为 35%左右, 2~2.5 h 时均达到 100%并保持稳定, 至 5 h 含量均无明显变化。因此, 样品酸化后应在室温避光放置时间 3 h 后进样, 以保证闭环反应充分进行。HPTC 闭环反应时间图见图 3。



**图 3** HPTC 闭环反应时间图

**Fig 3** The graph shows the close-ring reaction over time of 10-hydroxycamptothecin

按 UV 对照品比较法测定含量, 测定的结果比 UV 吸收系数法低可能是因为实验所用仪器和对照品与制定国家标准时不同所带来的误差, 除 C 厂 1 批产品含量结果低于合格范围之外, 其余各批结果均符合规定; 而通过 HPLC 测定含量的结果则发现, C 厂的 6 批样品 HPLC 结果明显低于 UV 的结果, 且均不符合规定。结合 C 厂产品有关物质和含量测定的结果, 可以看出: 国家标准中采用的含量测定方法(UV 法)专属性差, 无法将 HPTC 注射液中的杂质分离, 故无法真正反映本品中主药的含量; HPLC 法则专属性强, 适合本品的有关物质检查和含量测定。

本试验所用的流动相为甲醇-水, 不含不挥

发性盐类, 较易转化为 LC-MS 的液相色谱条件, 为今后 HPTC 注射液及其他制剂中相关杂质进行全面的定性分析提供了参考。

## REFERENCES

- [1] HAN R. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China [J]. Stem Cells, 1994, 12(1): 53-63.
- [2] ZUFÍA L, ALDAZ A, GIRÁLDEZ J. Separation methods for camptothecin and related compounds [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 764(1/2): 141-159.
- [3] LORENCE A, NESSLER C L. Camptothecin, over four decades of surprising findings [J]. Phytochemistry, 2004, 65(20): 2735-2749.
- [4] State Drug Standard WS1-10001-(HD-0280)-2002(国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第三册) [S]. 2002: 275.
- [5] State Drug Standard YBH00472005(国家食品药品监督管理局标准)[S]. 2005.
- [6] LAN J, HU C Q, SONG D H. Content and impurities comparison of hydroxycamptothecin injection and hydroxycamptothecin for injection [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2003, 38(9): 702-704.
- [7] LOU Z H, SUN Huang, JIANG L G, et al. HPLC determination of related substances in hydroxycamptothecin injection [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2009, 29(3): 483-486.

收稿日期: 2010-10-11

## 《药物评价研究》2012 年征订启事

《药物评价研究》杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级期刊，双月刊，国内外公开发行。

办刊宗旨：报道药物评价工作实践，推动药物评价方法研究，开展药物评价标准或技术探讨，促进药物评价与研究水平的提高，为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目：针对药物及其制剂的评价规范以及药学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容，设置论坛、综述、方法学研究、试验研究（论著）、审评规范、国外信息、专题 7 个栏目。

读者对象：药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO 组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白，为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台，通过交流药物评价工作的实践经验，发展和完善评价的方法学，探讨评价相关的国际标准或指南，提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿，广大读者踊跃订阅！本刊自办发行，订阅请直接与编辑部联系！本刊热忱与中外制药企业合作，宣传推广、刊登广告（包括处方药品广告）。

编辑部地址：天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编：300193

电话：(022)23006822

传真：(022)23006822

电子信箱：DER@tiprpress.com

网址：www.中草药杂志社.中国 www.tiprpress.com

---

## 《儿科药学杂志》2012 年征订启事

《儿科药学杂志》由重庆医科大学儿童医院主办的目前我国儿科药学领域唯一的专业性学术刊物。国际标准连续出版物号：ISSN 1672-108X，国内统一连续出版物号：CN 50-1156/R。《儿科药学杂志》是中国科技论文统计源期刊，中国科技核心期刊，儿科学类核心期刊，被国内主要的文献数据库全文收录，被美国化学文摘（CA）收录。

辟有专家论坛、论著（基础研究、儿科临床药理、儿科药物治疗学、儿科临床药学、儿科药物制剂与质量控制）、药事管理与法规、综述、经验交流、编者·作者·读者等栏目。《儿科药学杂志》是指导我国儿科药物研究和临床合理用药，提高儿科临床药物治疗水平的重要的科技期刊。以全国儿童（科）医院、妇幼保健院（所、站）、综合医院儿科的医学、药学工作者及基层医务人员，全国从事儿童药品研究、开发、生产、流通的相关人员及医药院校师生、药事管理人员等为主要读者对象。

本刊 2012 年由双月刊变更为月刊，大 16 开 64 页，铜版纸精美印刷，每月 10 日出版，每册定价 9.00 元，全年 108.00 元。全国各地邮局均可订阅，邮发代号：78-133。未及时订阅者，可直接向编辑部订购。

编辑部地址：重庆市渝中区中山二路 136 号重庆医科大学儿童医院内《儿科药学杂志》编辑部

邮编：400014

电话：(023)63633143

传真：(023)63626877

E-mail: ymjd2003@163.com

儿科药学杂志投稿网址：<http://www.ekyxzz.com>。欢迎订阅和投稿！