

# HPLC法测定盐酸伊立替康注射液的含量和有关物质

余春梅\*, 杨秀丽#, 郑小锋, 陈家香, 邹意琼, 陈 兰(西南药业股份有限公司药物研究所, 重庆 400038)

中图分类号 R927.2; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1600-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.24

**摘要** 目的:建立盐酸伊立替康注射液含量及有关物质测定的方法。方法:采用高效液相色谱法,色谱柱为Hypersile Luna(2) C<sub>18</sub>,流动相为水溶液(含0.02 mol/L磷酸二氢钠和0.008 mol/L辛烷磺酸钠)-乙腈-甲醇(59:17:24, V/V/V),流速为1.5 ml/min,检测波长为255 nm,柱温为40 ℃。结果:盐酸伊立替康检测质量浓度线性范围为98.5~985.0 μg/ml( $r=0.999\ 97$ ),检测限为1.2 ng;高、中、低3种浓度水平的平均回收率分别为99.4%、99.8%、99.6%( $n=3$ ),RSD分别为0.12%、0.10%、0.15%( $n=3$ )。结论:建立的方法准确,适用于盐酸伊立替康制剂的质量控制。

**关键词** 盐酸伊立替康注射液;高效液相色谱法;含量测定;有关物质

## Determination of the Content and Related Substance of Irinotecan Hydrochloride Injection by HPLC

YU Chun-mei, YANG Xiu-li, ZHENG Xiao-feng, CHEN Jia-xiang, ZOU Yi-qiong, CHEN Lan(Institute of Pharmacy, Southwest Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 400038, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for determination of the content and related substance of Irinotecan hydrochloride injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersile Luna(2) C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water (containing 0.02 mol/L sodium acid phosphate and 0.008 mol/L octanesulfonic acid sodium)-acetonitrile-methanol (59:17:24, V/V/V) at the flow rate of 1.5 ml/min. The detection wavelength was set at 255 nm, and the column temperature was controlled at 40 ℃. RESULTS: The linear range of irinotecan hydrochloride was 98.5-985.0 μg/ml ( $r=0.999\ 97$ ) and the detection limit was 1.2 ng; average recovery rates of high, middle and low concentrations were 99.4%, 99.8% and 99.6% ( $n=3$ ), and RSDs were 0.12%, 0.10%, 0.15% ( $n=3$ ). CONCLUSIONS: The method is accurate, and it is suitable for the quality control of Irinotecan hydrochloride preparation.

**KEY WORDS** Irinotecan hydrochloride injection; HPLC; Content determination; Related substance

盐酸伊立替康为喜树等植物中含有的抗肿瘤生物碱——喜树碱的水溶性衍生物,其可抑制 I 型 DNA 拓扑异构酶而阻碍 DNA 的合成,从而显示抗肿瘤活性。本品及其代谢产物 SN-38 对细胞周期 S 期具有特异性抑制作用<sup>[1-3]</sup>。其制剂制备和应用较多,本公司生产的盐酸伊立替康注射液即是其中的一种。为控制该产品质量,笔者建立了测定盐酸伊立替康注射液<sup>[4-6]</sup>的含量和有关物质的高效液相色谱(HPLC)法。结果表明,建立的方法简便、快捷、准确,适用于盐酸伊立替康制剂的质量控制。

## 1 材料

1200 型 HPLC 仪、紫外检测器、二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); AB204-E 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); H66MC 超声仪(无锡超声电子设备厂)。

盐酸伊立替康注射液(自制,批号:110701、110702、110703,规格:2 ml:40 mg);盐酸伊立替康对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100767-201102,纯度:93.4%);甲醇、乙腈均为色谱纯,磷酸二氢钠等均为分析纯,水为注射用水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱:Hypersile Luna(2) C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:水溶液(含0.02 mol/L磷酸二氢钠和0.008 mol/L辛烷

磺酸钠)-乙腈-甲醇=59:17:24(V/V/V),流速:1.5 ml/min;检测波长:255 nm;柱温:40 ℃;进样量:15 μl。在此色谱条件下,取有关物质供试品溶液进样,盐酸伊立替康与有关物质峰的分离度大于1.5,盐酸伊立替康的拖尾因子小于1.5,详见图1。

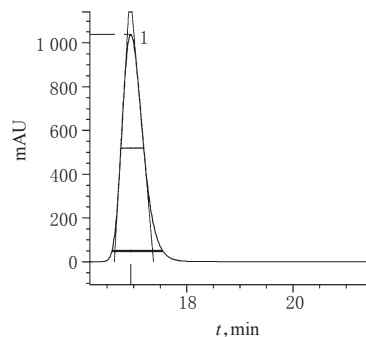


图1 系统适用性试验图谱  
1. 盐酸伊立替康

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability

1. irinotecan hydrochloride

### 2.2 测定方法

2.2.1 含量测定。取本品,加流动相溶解并稀释制成每1 ml 约含1.0 mg 的溶液,摇匀,作为供试品溶液。另取对照品适量,同法操作,作为对照品溶液。取供试品溶液和对照品溶液各15 μl 注入色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算,即得。

\* 副高级工程师,硕士。研究方向:新药研制。电话:023-89855604。E-mail:yym63318505@sina.com

# 通信作者:副高级工程师。研究方向:质量研究。电话:023-89855207。E-mail:Haibin@163.com

2.2.2 有关物质测定。精密量取“2.2.1”项下供试品溶液 1 ml 置于 100 ml 量瓶中,用流动相稀释至刻度,作为对照溶液。取对照溶液 15  $\mu$ l 注入色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 20%;另取供试品溶液 15  $\mu$ l,注入色谱仪,记录色谱图至主成分色谱峰保留时间的 3 倍。供试品溶液中如有杂质峰,单个杂质峰不得大于对照溶液主峰 0.2 倍 (0.2%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积 (1.0%)。

### 2.3 方法学验证

2.3.1 最低检测限。取对照品溶液,以流动相稀释制成系列浓度,分别进样,以信噪比为 3 时确定检测限为 1.2 ng。

2.3.2 线性试验。取盐酸伊立替康对照品适量,精密称定,加流动相溶解并制成 98.5、197.0、295.5、492.5、985.0  $\mu$ g/ml 的溶液,分别进样,记录峰面积。以峰面积 ( $A$ ) 对质量浓度 ( $c$ ) 进行回归分析,得回归方程为  $A = -196.12 + 12.01c$  ( $r = 0.99997$ )。结果表明盐酸伊立替康检测质量浓度线性范围为 98.5~985.0  $\mu$ g/ml。

2.3.3 精密度试验。取“2.2.1”项下的对照品溶液,连续进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 为 0.09%,表明本法精密度好。

2.3.4 回收率试验。取样品适量,加流动相溶解制成含盐酸伊立替康高、中、低 (1.2、1.0、0.8 mg/ml) 3 种水平的溶液各 3 份,取 15  $\mu$ l 注入色谱仪,记录峰面积;另取盐酸伊立替康对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释制成每 1 ml 约含 1.0 mg 的溶液,同法操作;按外标法以峰面积计算。结果,盐酸伊立替康高、中、低 3 种水平的加样回收率分别为 99.4% (99.4%、99.6%、99.3%, RSD=0.12%)、99.8% (99.9%、99.8%、99.7%, RSD=0.10%)、99.6% (99.7%、99.5%、99.5%, RSD=0.15%), 平均回收率为 99.6% (RSD=0.12%)。

2.3.5 溶液稳定性试验。取“2.2.1”项下的供试品溶液,在 0、2、4、6、8 h 时,分别取样进样分析,测定主成分含量和有关物质的量。结果,单个杂质和总杂质质量基本无变化,主成分、单个杂质和总杂质含量的 RSD 分别为 0.15%、1.72%、0。

2.3.6 耐用性试验。①流动相比比例变化的影响:将流动相的比例调整  $\pm 5\%$ ,取同一份供试品溶液,记录杂质峰的峰面积,以峰面积计算 RSD。结果 RSD=0.78% ( $n=8$ ),表明调整流动相比比例  $\pm 5\%$  时,方法耐用性良好。②柱温的影响:将柱温分别调为 35、40、45  $^{\circ}$ C,取同一份供试品溶液,照“2.2.2”项下方法操作,记录杂质峰峰面积,以峰面积计算 RSD。结果 RSD=0.29% ( $n=6$ ),表明柱温在 35~45  $^{\circ}$ C 变化时,耐用性良好。

2.3.7 专属性试验。供试品原液:精密称取样品,配制含盐酸伊立替康约为 1.0 mg/ml 的溶液,作为供试品原液。

精密称取样品 5 份,均加适量流动相溶解。1 份加入 1 mol/L 盐酸溶液 5 ml,80  $^{\circ}$ C 反应 2 h,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 ml 中和,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为酸破坏溶液;1 份加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml,80  $^{\circ}$ C 反应 2 h,加 1 mol/L 盐酸溶液 1 ml 中和,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为碱破坏溶液;1 份加 30% 过氧化氢溶液 2 ml,80  $^{\circ}$ C 反应 2 h,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为氧化破坏溶液;1 份在 100  $^{\circ}$ C 下加热 4 h,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为高温破坏溶液;1 份在 (4 500  $\pm$  500) lx 照度下照射 48 h,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为光照破坏溶液。另精密称取按处方比例配制的空白辅料适量,配制空白辅料溶液。分别取上述 7 种及对照品溶液各 15  $\mu$ l 进样,记录色谱图。结果显示,辅料不干扰主成分和有关物质测定,各杂质峰与主峰均能达到基线分离,表明本法专属性良好。破坏性试验色谱见图 2。

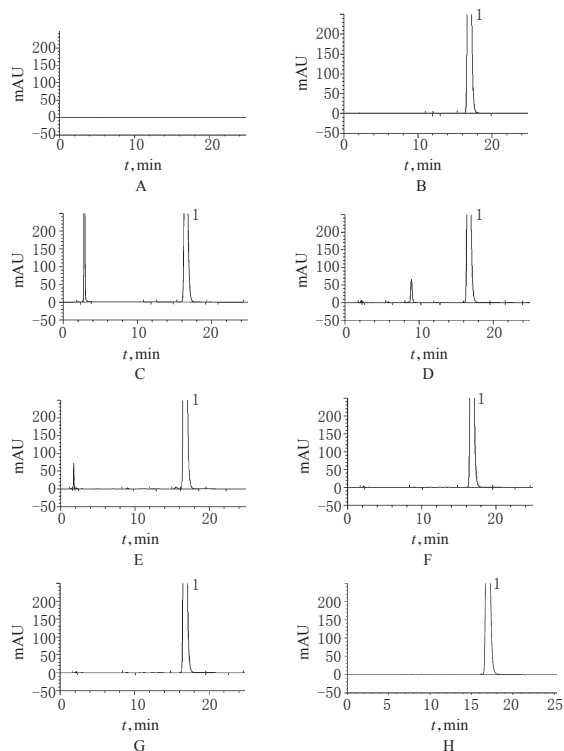


图 2 破坏性试验色谱图

A. 空白辅料溶液; B. 供试品原液; C. 酸破坏溶液; D. 碱破坏溶液; E. 氧化破坏溶液; F. 高温破坏溶液; G. 光照破坏溶液; H. 对照品溶液; 1. 盐酸伊立替康

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

A. blank excipient solution; B. sample stock solution; C. solution destroyed by acid; D. solution destroyed by alkali; E. solution destroyed by oxidation; F. solution destroyed by high temperature; G. solution destroyed by light; H. substance control solution; 1. irinotecan hydrochloride

2.3.8 样品测定。照“2.2”项下方法测定 3 批盐酸伊立替康注射液的含量及有关物质,结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab 1 Determination results of samples

| 批号     | 主成分含量, % | 有关物质, % |      |
|--------|----------|---------|------|
|        |          | 单个杂质    | 总杂质  |
| 110701 | 98.9     | 0.15    | 0.27 |
| 110702 | 98.3     | 0.13    | 0.29 |
| 110703 | 99.0     | 0.12    | 0.25 |

### 3 讨论

(1) 本文主要是建立盐酸伊立替康注射液的有关物质和主成分含量测定方法。由于原料药质检时已经对合成过程的中间体和副产物进行了控制,且在稳定性研究中这些杂质没有增加,因此建立有关物质方法时,只对单个杂质和总杂质的限度进行了严格的控制,而未控制已知杂质。

(2) 取盐酸伊立替康破坏性试验各溶液,经二极管阵列检测器检测。结果,盐酸伊立替康和破坏产生的杂质均在 255 nm 波长处有最大吸收,且溶剂和辅料在此波长处未见干扰,故确定本试验检测波长为 255 nm。

(3) 在前期流动相的筛选中,曾设计了多组不同组成 (磷酸盐-甲醇、磷酸盐-乙腈、辛烷磺酸钠-甲醇、辛烷磺酸钠-乙腈、辛烷/磷酸盐-甲醇、辛烷/磷酸盐-乙腈、辛烷/磷酸盐-甲醇-乙

# 注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查方法的建立

黄荣富\*, 厉青, 李龙健, 邵丽晓(武警浙江总队医院, 浙江嘉兴 314000)

中图分类号 R927.12;R973\*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1602-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.25

**摘要** 目的:建立注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素的检查方法。方法:按2010年版《中国药典》附录细菌内毒素凝胶检查法的要求,通过干扰试验确定样品最大无干扰浓度,并进行方法学验证。结果:样品稀释至0.04 U/ml时对细菌内毒素检查无干扰作用。结论:所建立的方法可用于注射用尖吻蝮蛇血凝酶的细菌内毒素检查。

**关键词** 注射用尖吻蝮蛇血凝酶;细菌内毒素检查;凝胶法;干扰试验

## Establishment of Bacterial Endotoxin Test of Haemocoagulase Agkistrodon for Injection

HUANG Rong-fu, LI Qing, LI Long-jian, SHAO Li-xiao(Zhejiang People's Armed Police Corps Hospital, Zhejiang Jiaxing 314000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for bacterial endotoxin test of Haemocoagulase agkistrodon for injection. METHODS: Maximum non-interference concentration of samples was determined by interference test according to bacterial endotoxin gel-clot assay in appendix of *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). And then methodology validation was conducted. RESULTS: The interference on bacterial endotoxin test can be excluded when sample was diluted to below 0.04 U/ml. CONCLUSIONS: The established method is feasible to detect the bacterial endotoxin of Haemocoagulase agkistrodon for injection.

**KEY WORDS** Haemocoagulase agkistrodon for injection; Bacterial endotoxin test; Gel-clot assay; Interference test

注射用尖吻蝮蛇血凝酶为止血药,通过水解纤维蛋白原使其变为纤维蛋白而增强机体的凝血功能,临床辅助用于外科手术浅表创面的止血。由于本品为蛋白类物质,制剂工艺复杂,在提取、生产过程中较易引入细菌内毒素,在药品的保管过程中应按要求在凉暗处保存,使用时必须在临用前配置。目前未见注射用尖吻蝮蛇血凝酶细菌内毒素检查法的报道。本文通过试验,探讨建立用细菌内毒素凝胶检查法检测注射用尖吻蝮蛇血凝酶中细菌内毒素的可行性。

### 1 材料

BET-32细菌内毒素测定仪(天津市天大天发科技有限公司);ZH-2自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);BS-1300U型超净工作台(苏州净化设备有限公司);SC-101型鼓风电热恒温干燥箱(浙江嘉兴市新腾电器设备有限公司);玻璃

器材包括试管、刻度吸管等均经250℃干烤1h除细菌内毒素处理。

注射用尖吻蝮蛇血凝酶样品(北京康辰药业有限公司,批号:20120123、20120310、20120411,规格均为:每支1U);鲎试剂[湛江安度斯生物有限公司,批号:1010211,标示灵敏度( $\lambda$ )为0.25 EU/ml;福州新北生化工业有限公司,批号:1007121, $\lambda$ 为0.25 EU/ml,每支均为0.1 ml];细菌内毒素工作标准品(CSE,批号:1010150,规格:每支10 EU)、细菌内毒素检查用水(BET水,批号:0912150,规格:每支5 ml)均为湛江安度斯生物有限公司产品。

### 2 方法与结果

#### 2.1 鲎试剂灵敏度复核试验

根据2批鲎试剂灵敏度的标示值,将CSE用BET水溶解,

腈)流动相系统。结果认为,乙腈-甲醇-水溶液(含有适量磷酸二氢钠和辛酸磺酸钠)组成的流动相系统优于单一的甲醇和乙腈与缓冲盐组成的系统。通过调整其不同的体积比,如辛酸(磷酸盐-乙腈-甲醇(50:25:25)、(55:20:25)、(59:16:25)、(59:17:24)等,最终确立了本试验采用的流动相。在该流动相下,主峰出峰时间合适,杂质峰与主峰能够完全分离,适合本品主成分含量和有关物质的测定。

(4)本方法流动相中有离子对试剂,虽然可能对分析柱损害较大,但可以更好地保持主峰的峰形,使其拖尾因子符合要求,测定结果更准确。

(5)破坏性试验中,由于本品在常温下反应时基本无新的降解产物产生,故均在80℃下进行破坏试验。

### 参考文献

- [1] 杨建坤,商亚贞,刘宏伟,等.盐酸伊立替康的药理特性及其临床应用[J].河北职工医学院学报,2007,24(1):61.
- [2] 安云婷,郑子雯.伊立替康联合铂类治疗复发性卵巢癌临床研究[J].实用肿瘤杂志,2007,27(1):88.
- [3] 雷妍玮,宫深谋.伊立替康联合希罗达一线治疗晚期大肠癌近期疗效观察[J].中国实用医药,2012,7(3):171.
- [4] 李语如,顾萍,蒋素梅,等.盐酸伊立替康及注射液的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2001,32(6):268.
- [5] 邱永红,戈延茹,王成润,等.盐酸伊立替康脂质体冻干粉针的制备和质量评价[J].江苏大学学报:医学版,2009,19(4):314.
- [6] 鲁军,牛玉娟,王戈.HPLC测定盐酸伊立替康脂质体注射液中的溶血卵磷脂[J].中国药事,2009,23(5):457.

(收稿日期:2012-12-19 修回日期:2013-02-17)

\* 副主任药师。研究方向:医院药学。E-mail:wjyylj@sohu.com