

UPLC法同时测定盐酸阿糖胞苷原料药的含量和有关物质

海丽萍^{1*}, 杨东菁², 王志远³, 王雪芹^{4#}(1.河南省直属机关第一门诊部, 郑州 450003; 2.河南大学医学院, 河南开封 475001; 3.河南大学药学院, 河南开封 475001; 4.河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1137-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.28

摘要 目的:建立同时测定盐酸阿糖胞苷原料药的含量和有关物质的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为 Inertsil ODS-3 C₁₈, 流动相为磷酸盐缓冲液-甲醇(梯度洗脱),流速为 0.8 ml/min,检测波长为 254 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μl。结果:尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷、盐酸阿糖胞苷检测质量浓度分别在 0.100 8~20.16、0.1~20.12、0.095 6~19.12、0.1~20.004 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD $\leq 0.79\%$;尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷平均加样回收率为 103.8%、102.2%、99.7%,RSD 分别为 2.44%、2.69%、3.16%($n=9$)。结论:该方法准确、灵敏度高、专属性强、重复性好,可用于盐酸阿糖胞苷原料药的质量控制。

关键词 盐酸阿糖胞苷;尿嘧啶;尿苷;阿糖尿苷;超高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of Cytarabine Hydrochloride and Related Substances by UPLC

HAI Li-ping¹, YANG Dong-jing², WANG Zhi-yuan³, WANG Xue-qin⁴(1.First Outpatient Department, Departments Directly under Henan Province, Zhengzhou 450003, China; 2.Medical College of Henan University, Henan Kaifeng 475001, China; 3.Pharmaceutical College of Henan University, Henan Kaifeng 475001, China; 4.Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of cytarabine hydrochloride and related substance. METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil ODS-3 C₁₈ column with mobile phase consisted of phosphate buffer-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min; the detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 40 ℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The liner ranges were 0.100 8-20.16 μg/ml for uracil ($r=0.999\ 9$), 0.1-20.12 μg/ml for uridine ($r=0.999\ 8$), 0.095 6-19.12 μg/ml for 1-β-D-arabino furanosyl-uracil ($r=0.999\ 9$) and 0.1-20.004 μg/ml for cytarabine hydrochloride ($r=0.999\ 9$), respectively. RSD of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 0.79%; average recoveries of uracil, uridine and 1-β-D-arabino furanosyl-uracil were 103.8% (RSD=2.44%, $n=9$), 102.2% (RSD=2.69%, $n=9$) and 99.7% (RSD=3.16%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive, specific and reproducible, and can be used for the quality control of cytarabine hydrochloride.

KEYWORDS Cytarabine hydrochloride; Uracil; Uridine; 1-β-D- arabino furanosyl -uracil; UPLC; Content determination

阿糖胞苷为嘧啶类抗代谢药,主要用于治疗急性粒细胞白血病及消化道肿瘤,是治疗白血病最常见的药物^[1]。盐酸阿糖胞苷为阿糖胞苷的盐酸盐。美国药典(USP)、英国药典(BP)等均只收载阿糖胞苷原料药的检测质量标准^[2-3],而《中国药典》2010年版收载了盐酸阿糖胞苷(原料药)的检测质量标准^[4]。BP收载的有关物质测定采用薄层色谱(TLC)法,含量测定采用非水滴定法;USP与《中国药典》收载的有关物质和含量测定均采用高效液相色谱(HPLC)法,但色谱条件有所不同。笔者参照了相关文献^[5-9],采用超高效液相色谱(UPLC)法同时对盐酸阿糖胞苷原料药中主成分和有关物质的含量进行测定,以为其质量控制提供参考。

1 材料

Acquity系列UPLC仪,包括四元梯度泵、自动进样器、光电二极管阵列检测器、Empower工作站(美国Waters公司);XR205SM-DR电子天平(瑞士Precisa公司)。

*主管药师。研究方向:医院药学。电话:0371-65907512

#通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0371-63388295。E-mail:wangxueqin2008@126.com

盐酸阿糖胞苷、阿糖尿苷对照品(美国Sigma公司,批号:SLBB7397V、031M5069V);尿嘧啶、尿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100469-200401、887-200202);盐酸阿糖胞苷原料药(河南信心制药有限公司,批号:20120401、20120402、20120403、20120801、20120802、20120803);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3 C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(流动相A,含0.01 mol/L磷酸二氢钠和0.01 mol/L磷酸氢二钠)-甲醇(流动相B),梯度洗脱程序见表1;流速:0.8 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃,进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取盐酸阿糖胞苷对照品0.039 69 g,置于5 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,得盐酸阿糖胞苷原溶液。取盐酸阿糖胞苷原溶液630 μl,置于10 ml量瓶中,加水至刻度,得对照品贮备液I。另取阿糖尿苷对照品0.004 78 g、尿嘧啶对照品0.005 04 g、尿苷对照品0.005 03 g,分

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution of mobile phase

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	98	2
10	98	2
20	70	30
25	70	30
30	98	2

别置于10 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得对照品贮备液Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密量取“2.2.1”项下盐酸阿糖胞苷原溶液20 μl,对照品贮备液Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ各100 μl,置于1 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品0.05 g,置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.4 空白对照溶液的制备 取不含盐酸阿糖胞苷的样品,按“2.2.3”项下方法制成空白对照溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 主成分含量测定的专属性考察 分别取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各10 μl,分别注入UPLC仪,记录色谱,详见图1。由图1可见,空白对照对盐酸阿糖胞苷含量测定无干扰。

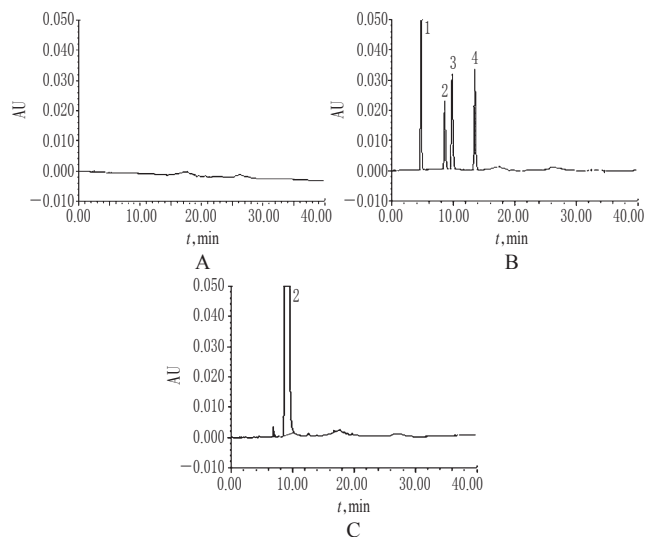


图1 超高效液相色谱图

A. 空白对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 尿嘧啶; 2. 盐酸阿糖胞苷; 3. 尿苷; 4. 阿糖尿苷

Fig 1 UPLC chromatograms

A. blank control; B. substance control; C. test sample; 1. uracil; 2. cytarabine hydrochloride; 3. uridine hydrochloride; 4. 1-β-D-arabino furanosyl-uracil

2.3.2 破坏性试验 (1)精密称取样品0.005 2 g,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液1 ml,室温放置0.5 h,用1 mol/L氢氧化钠溶液中和至中性,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(2)精密称取样品0.005 5 g,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠1 ml,室温放置0.5 h,用1 mol/L盐酸溶液中和至中性,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(3)精密称取样品0.005 3 g,置于10 ml量瓶中,加30%过氧化氢1 ml,室温放置0.5 h,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(4)精密称取样品0.005 2 g,于105 °C干燥6 h,置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,备用;(5)精密称取

样品0.005 1 g,于(4 500 ± 500) lx条件下照射8 h,置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,备用。精密量取上述5种溶液各10 μl,分别注入UPLC仪,记录色谱,详见图2。由图2可见,本品在强酸、强碱、氧化、高温、光照条件下,样品均被破坏产生降解产物,所产生的降解产物在“2.1”项色谱条件下均能达到较好的分离。主峰与降解产物峰、各个杂质峰之间分离度均大于1.5。

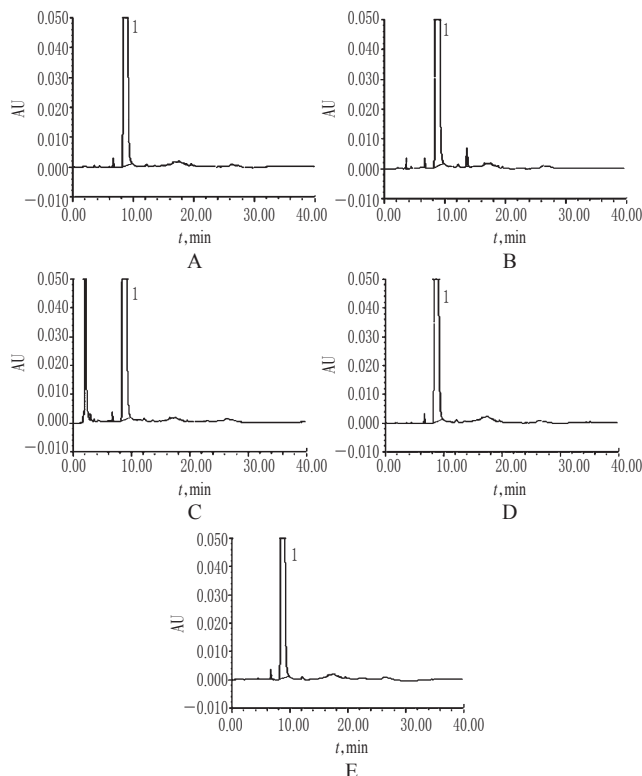


图2 破坏性试验超高效液相色谱图

A. 酸破坏样品; B. 碱破坏样品; C. 氧化破坏样品; D. 高温破坏样品; E. 光照破坏样品; 1. 盐酸阿糖胞苷

Fig 2 HPLC chromatograms of treated test

A. treated with acid; B. treated with alkali; C. treated with oxidation; D. treated with high temperature; E. treated with light; 1. cytarabine hydrochloride

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下4种对照品贮备液各0.4、0.2、0.1、0.05 ml,分别置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。按“2.1”项下色谱条件,分别取上述4种溶液10、5、3、2、1、0.5、0.3、0.1 μl进样,记录色谱。以检测质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,回归方程和线性范围见表2。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
尿嘧啶	$y = 5\,079.71x - 988.47$	$r = 0.999\,9$	0.100 8~20.16
尿苷	$y = 2\,662.26x - 4\,380.35$	$r = 0.999\,8$	0.1~20.12
阿糖尿苷	$y = 2\,630.86x - 2\,516.24$	$r = 0.999\,9$	0.095 6~19.12
盐酸阿糖胞苷	$y = 1\,673.46x - 2\,277.14$	$r = 0.999\,9$	0.1~20.004

2.5 检测限和定量限

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,以信噪比S/N=3:1计算盐酸阿糖胞苷、尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷的检测限,分别为3.00、1.008、3.018、2.868 ng;

以信噪比 $S/N=10:1$ 计算盐酸阿糖胞苷、尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷的定量限,分别为 10.00、3.024、5.03、4.78 ng。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液 10 μ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,结果,尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷、盐酸阿糖胞苷的 RSD 分别为 0.08%、0.28%、0.28%、0.54%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别于放置 0、1、2、3、5、6、10、15 h 时进样测定。结果,尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷、盐酸阿糖胞苷的 RSD 分别为 0.07%、0.25%、0.37%、0.65%,表明 15 h 内对照品溶液稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20120401)适量,共 6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算各成分含量。结果,尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷均未检出,其它单杂(胞苷)的量平均为 0.002%,RSD=0.79%,表明本方法重复性良好。

2.9 有关物质加样回收率试验

精密称取样品(批号:20120401)共 9 份,每份约 0.05 g,分别置于 10 ml 量瓶中,精密加入“2.1”项下对照品溶液适量,加水稀释至刻度,摇匀,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表 3。

表 3 有关物质加样回收率试验结果 ($n=9$)

待测成分	所含量, ng	加入量, ng	测得量, ng	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
尿嘧啶	0	25.2	26.79	106.30	103.8	2.44
	0	25.2	27.00	107.13		
	0	25.2	27.08	107.45		
	0	50.4	51.01	101.21		
	0	50.4	51.00	101.19		
	0	50.4	51.02	101.23		
	0	100.8	104.21	103.38		
	0	100.8	104.32	103.49		
	0	100.8	104.02	103.19		
	0	100.8	104.02	103.19		
尿苷	0	35.21	36.89	104.77	102.2	2.69
	0	35.21	34.76	98.72		
	0	35.21	35.70	101.39		
	0	60.36	63.36	104.97		
	0	60.36	64.26	106.46		
	0	60.36	62.52	103.58		
	0	115.69	116.10	100.35		
	0	115.69	115.92	100.20		
	0	115.69	115.39	99.74		
	0	115.69	115.39	99.74		
阿糖尿苷	0	28.68	26.80	93.46	99.7	3.16
	0	28.68	27.94	97.43		
	0	28.68	27.75	96.77		
	0	50.19	50.50	100.62		
	0	50.19	50.63	100.89		
	0	50.19	50.38	100.38		
	0	95.6	98.45	102.99		
	0	95.6	97.46	101.95		
	0	95.6	97.46	101.95		
	0	95.6	98.06	102.57		

2.10 样品含量测定

取 6 批样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并

按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,按外标法以峰面积计算含量,结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果 ($\%$, $n=3$)

批号	盐酸阿糖胞苷
20120401	99.8
20120402	99.9
20120403	101.4
20120801	100.8
20120802	100.0
20120803	100.1

2.11 相对保留时间及相对校正因子的测定

以盐酸阿糖胞苷为参照物,按公式 $f_k = \frac{f_k}{f_s} = \frac{W_k \times A_s}{W_s \times A_k}$ 计算

尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷对盐酸阿糖胞苷的相对保留时间及相对校正因子。式中, f_k 为待测组分 k 的校正因子, f_s 为参照物的校正因子, A_k 为待测组分 k 的峰面积, W_k 为待测组分 k 的质量浓度, A_s 为参照物的峰面积, W_s 为参照物的质量浓度。结果,尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷的相对保留时间分别为 0.53、1.14、1.55,相对校正因子分别为 2.92、1.73、1.55。

2.12 样品有关物质测定

精密称取样品 50 mg,置于 10 ml 量瓶中,加水溶解并稀释成每 1 ml 含 5 mg 的溶液,作为有关物质测定供试品溶液。取盐酸阿糖胞苷对照品适量,精密称定,用水溶解并定量稀释制成每 1 ml 含 5 μ g 的溶液作为有关物质测定对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件,取上述对照品溶液 10 μ l,注入 UPLC 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%。再精密量取上述供试品溶液与对照品溶液各 10 μ l,分别注入 UPLC 仪,测定并计算盐酸阿糖胞苷的含量。结果,尿嘧啶峰、尿苷峰、阿糖尿苷峰对盐酸阿糖胞苷峰的相对保留时间分别为 0.53、1.14、1.55,尿嘧啶峰、尿苷峰、阿糖尿苷峰对盐酸阿糖胞苷峰的相对校正因子分别为 2.92、1.73、1.55;对盐酸阿糖胞苷峰的相对保留时间约为 0.38、0.43 的色谱峰的相对校正因子均为 1.72,其他杂质峰的相对校正因子均按 1.1 计算。结果见表 5。

表 5 样品有关物质测定结果 ($\%$)

Table 5 Results of content determination of related substances in samples ($\%$)

样品	已知有关物质的含量			未知有关物质的含量		有关物质总含量
	尿嘧啶	尿苷	阿糖尿苷	单个杂质 1(胞苷)	单个杂质 2	
20120401	未检出	未检出	未检出	0.025	0.000	0.025
20120402	未检出	未检出	未检出	0.024	0.000	0.024
20120403	未检出	未检出	未检出	0.021	0.000	0.021
20120801	未检出	未检出	未检出	0.023	0.013	0.036
20120802	未检出	未检出	未检出	0.023	0.019	0.042
20120803	未检出	未检出	未检出	0.022	0.014	0.036
20120801 加速 3 月	未检出	未检出	0.153	0.044	0.014	0.211
20120801 加速 6 月	未检出	未检出	0.200	0.032	0.024	0.256
20120801 长期 6 月	未检出	未检出	0.006	0.025	0.020	0.051

3 讨论

3.1 检测波长的选择

色谱图中可见尿嘧啶、尿苷、阿糖尿苷及盐酸阿糖胞苷的最大吸收波长分别为 259.9、262.1、263.3 和 272.5 nm,但由于盐

HPLC法测定卡托普利片含量的测量不确定度评定

秦立^{1*}, 肖英², 范亚刚¹(1. 云南省食品药品检验所, 昆明 650011; 2. 山东省食品药品检验所, 济南 250101)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1140-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.29

摘要 目的: 评定高效液相色谱(HPLC)法测定卡托普利片含量的测量不确定度。方法: 建立HPLC法测定卡托普利片含量的数学模型, 分析测量不确定度的影响因素并对各因素进行评估, 给出扩展测量不确定度报告。结果: HPLC法测定卡托普利片含量的扩展测量不确定度为1.2%, 测量结果表示为(100.3±1.2)%, $k=2$ 。结论: 明确产生不确定度的主要来源, 可为有效地控制该含量测定方法的准确性提供可靠的理论依据。

关键词 卡托普利片; 高效液相色谱法; 含量测定; 测量不确定度

Evaluation of Uncertainty for the Content Determination of Captopril Tablets by HPLC

QIN Li¹, XIAO Ying², FAN Ya-gang¹(1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the uncertainty evaluation for the determination of Captopril tablets by HPLC. METHODS: Mathematical model was established for HPLC for the content determination of Captopril tablets to identify influential factors of uncertainty, evaluate the uncertainty factors and report expanded measurement uncertainty. RESULTS: The expanded uncertainty for the content determination of Captopril tablets as 1.2%, and the result of content determination was (100.3±1.2)% ($k=2$). CONCLUSIONS: Main source of uncertainty should be clear and definite, which can provide theory evidence for accuracy control of the measurement method.

KEYWORDS Captopril tablets; HPLC; Content determination; Uncertainty

酸阿糖胞苷在254 nm波长处的吸收较强, 既可以保证杂质的检出, 又能够准确地测定主成分含量, 故选择254 nm作为本方法的检测波长。

3.2 流动相的选择

笔者研究发现, 流动相中0.01 mol/L磷酸氢二钠和0.01 mol/L磷酸二氢钠溶液的pH均为6.86, 缓冲力较大, 且较稳定。若将pH调至6.0或7.0, 则需加入大量的稀酸或稀碱, 不易控制, 色谱峰易分叉。另外, 由于本品黏度较大, 重复多次进样后色谱柱上残留物不易洗脱干净, 柱压不断升高, 因此在梯度洗脱主成分和主要杂质出峰后, 增加了甲醇的比例, 有利于洗脱色谱系统中残留杂质, 保持色谱条件的稳定。

3.3 色谱柱的选择

笔者曾尝试采用了3根不同品牌的C₁₈色谱柱, 两台不同型号的UPLC仪, 分别在不同时间点采用本研究中的色谱条件进行测定。结果发现, Inertsil ODS-3 C₁₈分离效果最好, 无干扰, 灵敏度高, 且峰形较好。

3.4 样品的稳定性

在破坏性试验中均检出了尿嘧啶和尿苷, 加速试验和长期试验中均检出了阿糖尿苷。盐酸阿糖胞苷对温度较敏感, 可在放置过程中降解产生阿糖尿苷。因此, 在贮藏时应注意温度对样品质量的影响。

综上所述, 本方法准确、灵敏度高、专属性强、重复性好, 可作为盐酸阿糖胞苷原料药的质量控制方法。

参考文献

- [1] 李莉霞, 唐跃年. 阿糖胞苷抗白血病药理作用及耐药机制的研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17(19): 1506.
- [2] British Pharmacopoeia Commission. BP 2013[S]. 2012: 631.
- [3] The United States Pharmacopoeia Convention. USP35-NF30[S]. 2012: 2800.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 716.
- [5] 左英熹, 李良, 卢炜, 等. 高效液相色谱法测定体内脱氧核糖核酸结合的阿糖胞苷浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(9): 718.
- [6] 张虹, 方昱, 李英, 等. 高效液相色谱法测定细胞内三磷酸阿糖胞苷的浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(18): 1564.
- [7] 梁蔚阳. 高效液相色谱法测定阿糖胞苷注射液中有关注物质的含量[J]. 药物生物技术, 2009, 16(5): 460.
- [8] 林焕泽, 蓝忠, 杨华, 等. 反相高效液相色谱法测定注射用盐酸阿糖胞苷的有关物质[J]. 中国药业, 2009, 18(15): 27.
- [9] 许双临, 陈子春, 林宇涵, 等. 大剂量阿糖胞苷治疗时血浆阿糖胞苷及阿糖尿苷的HPLC测定方法[J]. 海峡药学, 2013, 25(7): 128.

(收稿日期: 2013-12-14 修回日期: 2014-1-13)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药品质量分析。电话: 0871-63130536。E-mail: qinli2112@gmail.com