

文章编号:1000-5641(2008)04-0102-07

替尼泊昔注射液含量及有关物质的 HPLC-ECD 分离检测

金薇^{1,2}, 彭兴盛², 杨永健², 叶建农¹

(1. 华东师范大学 化学系, 上海 200062; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 建立以高效液相色谱电化学检测对替尼泊昔及其有关物质进行分离分析的方法. 研究了电化学安培检测中电位与检测量的关系, 比较了电化学安培检测(ECD)和紫外检测两种不同的检测方法. 以乙腈-水(38:62)为流动相, 流速为1.0 mL/min, 以 PhenomenexR LUNA Phenyl-Hexyl 柱, 玻碳圆盘电极为工作电极, 银-氯化银电极为参比电极, 在+0.7 V 电位处, 实现了替尼泊昔及其有关物质与注射液中的赋形剂的分离分析. 电化学安培检测与紫外检测相比, 具有较高的灵敏度和选择性, 能有效地应用于替尼泊昔注射液中有关物质的检测和含量的测定.

关键词: 高效液相色谱; 电化学安培检测; 替尼泊昔; 有关物质

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A

Separation and determination of teniposide and related substances in its injection by HPLC-ECD

JIN Wei^{1,2}, PENG Xing-sheng², YANG Yong-jian², YE Jian-nong¹

(1. Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China;
2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: To establish an HPLC-electrochemical detection method to separate and determine teniposide and its related substances on a PhenomenexR LUNA Ph-Hex column, the condition of electrochemical detection was studied and the difference between electrochemical detection and UV detection was compared. Teniposide, lignan P, alpha-thenylidene lignan P(ATLP), picrothenylidene lignan P(PTLP) and the excipients of the injection were well separated using an acetonitrile-water(38:62) as mobile phase when the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection sensitivity was the highest when the working potential was set at +0.7 V using the glassy carbon disc electrode as the working electrode. Compared with the UV detection method, the sensitivity and selectivity of electrochemical detection are higher. It can be employed in the detection of impurities in Teniposide injection efficiently without any disturbance and the assay of teniposide.

Key words: HPLC; electrochemical detection; teniposide; related substances

收稿日期:2007-06

第一作者:金薇,女,副主任药师,博士研究生,研究方向为药物分析. E-mail: kingweifh@yahoo.com.cn.

通讯作者:叶建农,男,教授,博士生导师,研究方向为生物电分析化学. E-mail: jnyec@cnu.edu.cn.

0 引言

替尼泊苷化学名为 4-O 去甲基-1-O(4,6-O,2-噻吩甲叉- β -D-吡喃葡萄糖甙)表鬼臼毒,结构如图 1 所示,y 是周期特异性细胞毒药物,作用于细胞周期 S2 后期和 G2 期,通过阻止细胞进入有丝分裂而起作用.亦引起 DNA 键的单股性和双股性断裂(Clark, 1987),其作用机理似为抑制拓扑异构酶 II (Topoisomerase II) 所致.对实验性鼠肿瘤,替尼泊苷在其体内具有广谱的抗肿瘤活性,包括多种血液系统肿瘤和各种实体瘤.药代动力学^[1]表明替尼泊苷为中性亲脂性物质,可以通过血脑屏障.通常与其他抗癌药物联合使用治疗恶性淋巴瘤,霍奇金氏病,急性淋巴细胞性白血病,成人与儿童的高危病例,颅内恶性肿瘤,空管膜瘤,星形细胞瘤,膀胱癌,神经母细胞瘤和儿童的其它实体瘤.

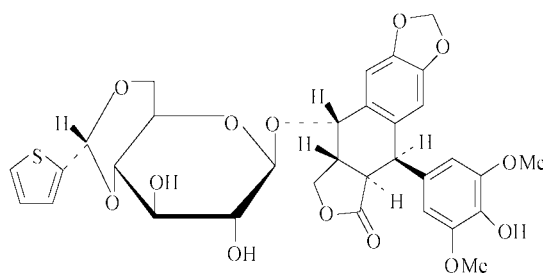


图 1 替尼泊苷的结构图

Fig.1 Structure of teniposide

药物分析中制剂中的有关物质来源包括原料、辅料中带入及生产贮藏过程中产生的杂质,一般制剂检查关注的重点是生产贮藏过程中产生的杂质,因为原辅料中带入的杂质在原辅料检查中已经检查过.对于量较大且毒性较大的杂质一般需要进行结构确认.对于其它种类多量又小的一般杂质可以通过自身对照等方法进行总量控制.替尼泊苷注射液中需要对木酚素 P, α -亚乙基木酚素 P 和 β -亚乙基木酚素 P 等生产和贮存过程中可能存在的杂质即有关物质进行质量控制.另外替尼泊苷注射液中还含有苯甲醛、苯甲醇、N,N-二甲基甲酰胺、马来酸和乙醇等赋形剂.替尼泊苷注射液中替尼泊苷含量和有关物质的测定以及替尼泊苷某些代谢产物的检查的高效液相色谱紫外检测已见报道^[2-4],而替尼泊苷注射液中有关物质的高效液相色谱电化学检测方法还未见报道.为此,本文以 PhenomenexR LUNA Phenyl-Hexyl 柱,玻碳圆盘电极为工作电极首次建立了高效液相色谱电化学检测法直接测定替尼泊苷注射液中杂质和含量的方法,选择了合适的流动相,考察了电极电位对检测的影响,比较了紫外和电化学检测两种不同的检测方法,消除了各种赋形剂对测定的干扰,快速有效灵敏地控制了替尼泊苷注射液的质量.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(Agilent 科技公司),包括真空脱气机、二元梯度泵(G1311A)、自动进样器、柱温箱、电化学检测器(ECD)(1049A)、二极管阵列检测器(DAD)(G1315A)、LC ChemStation 化学工作站.三电极工作系统:玻碳圆盘工作电极,银-氯化银参比电极,铂丝对电极(Agilent 科技公司).

替尼泊苷对照品(纯度:98.9%,批号:2B47424),木酚素 P 对照品(纯度:98.1%,批号:

Ten-7-149), α -亚乙基木酚素 P 对照品(纯度:96.9%,批号:ATLP-2), 苦亚乙基木酚素 P 对照品(纯度:99.9%,批号:PTLP-2)均由百时美施贵宝(中国)投资有限公司提供. 替尼泊昔注射液(50 mg/5 mL/瓶,百时美施贵宝意大利分公司生产,批号:6H10123,6G14423,6J15564). 苯甲醇、苯甲醛、乙醇、N,N-二甲基甲酰胺、马来酸及磷酸二氢钾均为分析纯试剂,水为蒸馏水,乙腈为色谱纯(Merck 公司),流动相使用前用0.45 μm 滤膜过滤.

1.2 色谱条件及实验方法

采用 PhenomenexR LUNA Phenyl-Hexyl 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm),以乙腈-水(38:62)为流动相,流速为1.0 mL/min,采用电化学安培检测器,玻碳圆盘电极为工作电极,银-氯化银电极为参比电极,工作电位为+0.7 V;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10.0 μL . 整个实验前,需对玻碳圆盘电极在麂皮上用氧化铝混悬液进行抛光,再用乙醇和水超声清洗,以达到高的检测灵敏度.

1.3 溶液的制备

1.3.1 含量测定用标准溶液的制备

取替尼泊昔对照品适量,精密称定,加乙腈溶解并定量稀释制成每1 mL中各约含1 mg的溶液,作为标准贮备液. 分别精密量取一定体积的标准贮备液加溶剂(0.005 mol/L 磷酸二氢钾溶液-乙腈(1:1))稀释成一定浓度的标准溶液.

1.3.2 有关物质测定用标准溶液的制备

取木酚素 P、替尼泊昔、 α -亚乙基木酚素 P 和苦亚乙基木酚素 P 对照品适量,精密称定,加乙腈溶解并定量稀释制成每1 mL中各约含0.3 mg,0.2 mg,0.15 mg 和0.15 mg 的溶液,作为有关物质测定用标准贮备液. 分别精密量取一定体积的标准贮备液加溶剂稀释成一定浓度的标准溶液.

1.3.3 样品溶液的制备

用内容量移液管精密量取替尼泊昔注射液1 mL,加溶剂定量稀释并制成含替尼泊昔0.01 mg/mL 的溶液.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

根据文献[3]报道,为了实现替尼泊昔注射液中各种有关物质(相关杂质)及赋性剂与主药的有效分离和有关物质的检测,需要选择梯度洗脱的方式. 采用乙腈和水进行梯度洗脱,在苯基己基色谱柱(250 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm)上以紫外检测器在220 nm 波长处实现了上述物质的有效分离,该色谱条件以较长的保留时间换取了有效的分离,样品一个分析周期至少需要90 min. 进行有关物质(相关杂质)的检查时,样品溶液配置后应尽快进样. 实验证明,样品放置时间过长,会导致主药的降解,无法保证有关物质的产生究竟是注射液本身带来的还是溶液配置好后时间放置过长导致的,影响了对注射液质量控制的判断. 如何既能够有效分离又能尽量缩短保留时间,正是本文所要解决的问题. 增加流动相中有机相(乙腈)的比例,各成分的保留时间减小. 比较一下采用乙腈-水(38:62)为流动相等度洗脱,主药替尼泊昔的保留时间仅为19.6 min,比较二极管阵列检测器(见图2)和电化学安培检测器(见图3)得到的色谱图,可以看到样品溶液紫外检测色谱图中防腐剂苯甲醇和苯甲醛分别在2.9 min 和5.2 min 有非常大的色谱峰出现,对有关物质木酚素 P 的测定有干扰,而相同条件下采用电化学安培检测则苯甲醇和苯甲醛等无电化学响应,不干扰木酚素 P 的测定,这样就

大大减少了分析检测时间,避免了因为放置时间过长引起的样品溶液的降解.采用 ODS 色谱柱试验,主药替尼泊昔的保留时间约为 7 min,系统适用性溶液各杂质亦能分离,但样品溶液中替尼泊昔的浓度较高,未能完全基线分离.故最终选择苯基己基色谱柱以乙腈-水(38 : 62)为流动相进行等度洗脱.

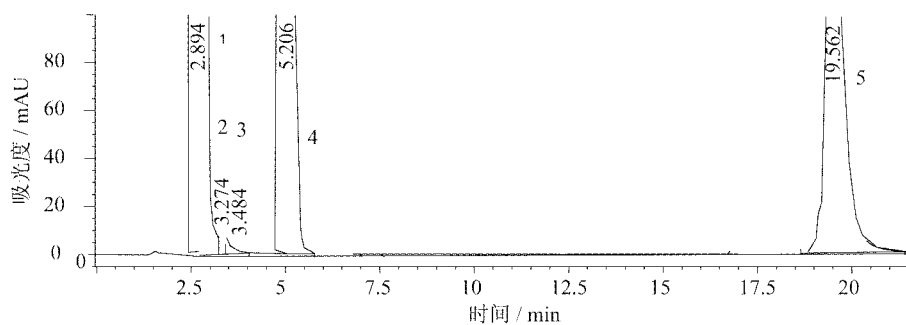


图2 典型样品溶液的紫外检测色谱图(检测波长:220 nm)

Fig. 2 Chromatogram of a typical sample solution with UV detection

注: column Phenyl-Hexyl (250 mm×4.6 mm i. d., 5 μm), detection wavelength 220 nm;

flow rate 1.0 mL/min, column temperature 30 °C, injection volume 10.0 μL;

1, 2 苯甲醇 (benzyl alcohol), 3 木酚素 P (lignan P), 4 苯甲醛 (benzaldehyde), 5 替尼泊昔 (teniposide)

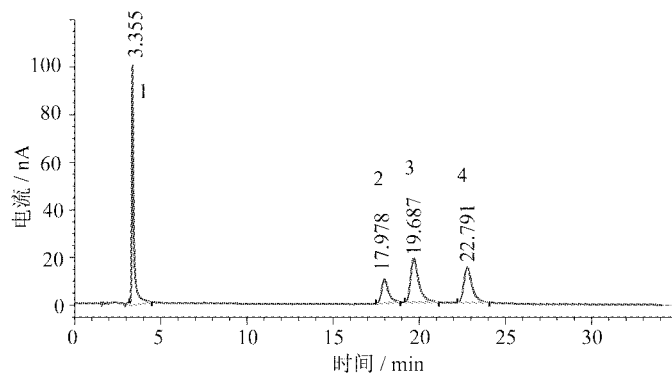


图3 标准混合溶液的电化学检测色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a mixed standard solution for system suitability

Chromatography conditions are the same as in Fig. 2 except the detection mode

(working electrode: glassy carbon disk electrode, reference electrode: Ag/AgCl, working potential: +0.7 V)

1 木酚素 P (lignan P), 2.4 μg/mL; 2 α-亚乙基木酚素 P (alpha-thenylidene lignan P, ATLTP), 1.4 μg/mL;

3 替尼泊昔 (teniposide), 2.3 μg/mL; 4 苦亚乙基木酚素 P (picrothenylidene lignan P, TPLP), 1.4 μg/mL

2.2 溶剂的选择

由于替尼泊昔为脂溶性化合物,替尼泊昔注射液为油溶液,所以本实验用乙腈先把对照品和样品配制成不同浓度的贮备液,然后用溶剂把样品和对照品稀释成不同浓度的溶液,注入高效液相色谱仪.

2.3 工作电极电位的选择

本文选用了玻碳圆盘电极进行试验,发现采用玻碳圆盘电极木酚素 P, α-亚乙基木酚素 P, 苦亚乙基木酚素 P 和替尼泊昔响应灵敏,重复性好,故采用碳圆盘电极进行试验.以乙腈-水(33 : 67)为流动相,在 +0.3 ~ +0.9 V 范围内考察了工作电位对检测灵敏度的影响

(见图 4). 随着电位的增加, 四种物质的检测灵敏度逐渐增加, 在 +0.7~+0.9 V 处达到最大, 并趋于平台. 在电化学检测器(ECD)上的响应远大于在二极管阵列检测器(DAD) 上的响应, 相同浓度下, 选择 +0.7 V 为工作电位时它们在 ECD 上的响应峰面积分别是其在最大吸收波长下响应峰面积的 17, 11, 12 和 12 倍. 故实验中选择 +0.7 V 为工作电位, 此时灵敏度较高, 信噪比最大.

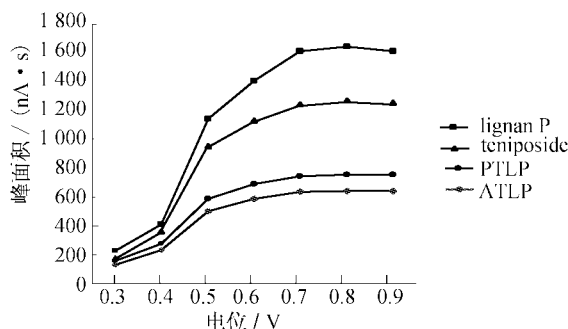


图 4 4 种有关物质的流体动力学伏安图

Fig. 4 Hydrodynamic voltammograms for 4 related compounds

Conditions are the same as in Fig. 3(1 lignan P, 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2 teniposide, 5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3 PTLP, 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 4 ATL P, 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.4 精密度、线性及检测下限

2.4.1 精密度试验

在上述优化条件下, 取含木酚素 P 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 替尼泊昔 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, α -亚乙基木酚素 P 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以及苦亚乙基木酚素 P 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液, 分别连续进样 5 次, 结果峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.6%, 1.0%, 1.0% 和 1.2%.

2.4.2 回归方程、线性范围及检测下限

2.4.2.1 含量测定用线性范围

配制一系列不同浓度的替尼泊昔标准溶液, 在选定条件下测定, 替尼泊昔的平均峰面积(Y)与浓度(X)在 0.002~0.03 mg/mL 范围内呈良好的线性关系, 回归方程: $Y = 127\ 260.57X + 6.628$ ($r = 1.000\ 0$).

2.4.2.2 有关物质测定用回归方程、线性范围及检测下限 配制一系列不同浓度的木酚素 P, 替尼泊昔, α -亚乙基木酚素 P 和苦亚乙基木酚素 P 混合标准溶液, 在选定色谱条件下, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 分别平行测定 3 次. 以平均峰面积 Y 对被测物的质量浓度 X ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行线性回归, 所得回归方程、线性范围、相关系数及检测下限如表 1 所示.

表 1 4 种成分的回归方程、线性范围、相关系数及最低检测量

Tab. 1 The regression equation, linear range and the detection limits of 4 components

化合物	回归方程 $Y = a + bX$ ①	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	相关系数	最低检测量/ng②
木酚素 P	$Y = 104.26X + 4.01$	0.119 7~5.985	0.999 7	0.24
替尼泊昔	$Y = 95.71X + 1.56$	0.112 7~5.635	1.000 0	1.1
α -亚乙基木酚素 P	$Y = 83.36X - 1.01$	0.058 14~3.488	0.999 8	1.0
苦亚乙基木酚素 P	$Y = 88.43X - 1.02$	0.072 33~3.616	0.999 8	0.7

注: ① Y 为平均峰面积, X 为被测物的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$);

② 最低检测量(S/N=3), 相同条件下紫外检测器 220 nm 波长处测得最小检测量分别为 5.8 ng, 10 ng, 10 ng 和 11 ng.

2.5 样品测定及回收率实验

2.5.1 样品含量测定

用内容量移液管精密量取样品 1 mL,加溶剂 定量稀释并制成含替尼泊昔0.01 mg/mL 的溶液,摇匀,精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪,按外标法以峰面积计算替尼泊昔的含量,3 批样品测定结果分别为102.5%,98.1%和101.2%($n=3$).

2.5.2 回收率试验

采用加样回收试验法,用内容量移液管精密量取批号为 6G14423 的样品0.5 mL,置 500 mL 容量瓶中,分别精密加入替尼泊昔标准贮备液(1 mg/mL)3.0 mL,5.0 mL 和7.0 mL,加溶剂稀释至刻度,摇匀,照含量测定项下方法测定,平均回收率为99.9%(RSD = 1.1%, $n=9$).

2.5.3 样品中有关物质的测定

用内容量移液管精密量取替尼泊昔注射液(批号:1-6H10123,2-6G14423,3-6J15564)样品,用溶剂稀释成0.4 mg/mL 的溶液作为供试品溶液,取 10 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图(见图 5,6),按外标法以峰面积计算木酚素 P, α -亚乙基木酚素 P 和苦亚乙基木酚素 P 的量,按替尼泊昔的校正因子计算其它未知杂质的量,测定结果及与紫外检测的结果比较见表 2.

表 2 两种检测器测定替尼泊昔有关物质含量的比较($n=3$)

Tab.2 Comparison of related substances of teniposide injection with different detectors($n=3$)

	电化学检测器(ECD)				紫外检测器(UV)			
	其他杂质 (other impurities)	木酚素 P (lignan P)	α -亚乙 基木酚素 P (ATLP)	苦亚乙基 木酚素 P (PTLP)	木酚素 P (lignan P)	α -亚乙 基木酚素 P (ATLP)	苦亚乙基 木酚素 P (PTLP)	其他杂质 (other impurities)
Lot. 1	0.39	/	/	/	0.39	/	/	/
Lot. 2	0.30	/	/	/	0.30	/	/	/
Lot. 3	0.34	0.01	0.01	0.01	0.34	/	/	/

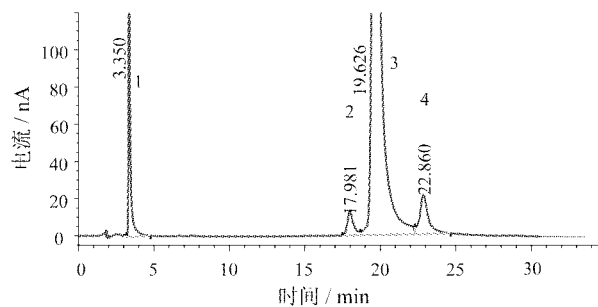


图 5 系统适用性用混合标准溶液 + 样品溶液(0.4mg/mL)的电化学检测色谱图

Fig.5 Chromatogram of mixed standard solution added sample solution with electrochemical detection

1 木酚素 P (lignan P), 3.6 μ g/mL; 2 α -亚乙基木酚素 P (ATLP), 1.4 μ g/mL;
3 替尼昔(teniposide), 0.4 mg/mL; 4 苦亚乙基木酚素 P (TLP), 1.4 μ g/mL

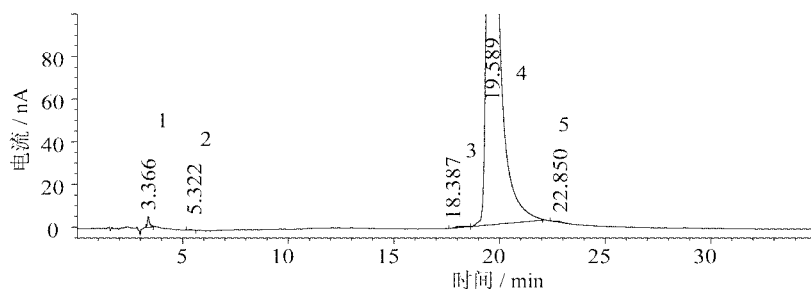


图6 样品溶液(0.4 mg/mL)的电化学检测色谱图

Fig.6 Chromatogram of teniposide and its related substances in sample solution with electrochemical detection

1 木酚素 P (lignan P), 2 未知杂质, 3 α -亚乙基木酚素 P (ATLP),
4 替尼泊苷 (teniposide), 5 苦亚乙基木酚素 P (TPLP)

3 结 论

本文研究表明,以苯基己基色谱柱,玻碳圆盘电极为工作电极的高效液相色谱电化学检测法直接测定木酚素 P, α -亚乙基木酚素 P, 苦亚乙基木酚素 P 和替尼泊苷,与紫外检测相比,具有较高的灵敏度和选择性,能有效地应用于替尼泊苷注射液中极微量有关物质的检测和替尼泊苷含量的测定,准确快速有效地进行替尼泊苷注射液生产运输及使用储藏过程中的质量控制。

[参 考 文 献]

- [1] CLARK P I, SLEVIN M L. The clinical pharmacology of etoposide and teniposide[J]. Clin Pharmacokin, 1987 (12): 223-252.
- [2] O'DWYER P J, KING S A, FORTNER C L, et al. Hypersensitivity reactions to teniposide (VM-26): An analysis [J]. J Clin Oncol, 1986(4): 1262-1269.
- [3] PANG S K, ZHENG N Y, FELIX C A, et al. Simultaneous determination of etoposide and its catechol metabolite in the plasma of pediatric patients by liquid chromatography / tandem mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2001, 36(7): 771-781.
- [4] 陈祝康, 彭兴盛. 高效液相色谱法测定替尼泊苷注射液的含量及有关物质 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(12): 938-940.
- [5] VAN OPSTAL M A, VAN DER HORST F A, HOLTHUIS J J, et al. Automated reversed-phase chromatographic analysis of etoposide and teniposide in plasma by using on-line surfactant-mediated sample clean-up and column-switching[J]. J Chromatogr, 1989, 27(10): 139-151.