

HPLC 测定注射用亚锡替曲膦(TF 药盒)中替曲膦的含量

陈志明, 虞燕华, 吴二明(江苏省原子医学研究所, 卫生部核医学重点实验室, 江苏省分子核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定注射用亚锡替曲膦(TF 药盒)中替曲膦含量的方法。方法 采用 Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm)的色谱柱, 以甲醇-水(85:15)为流动相, 检测波长为 215 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 替曲膦在 50~500 μg·mL⁻¹ 内成线性关系, $y=1.299\times 10^4+2.495\times 10^4x(r=0.9998)$, 平均回收率为 98.09%, RSD 为 0.63%。结论 本方法操作简便、准确, 可用于 TF 药盒中替曲膦含量的快速定量分析。

关键词: 高效液相色谱法; 替曲膦; 注射用亚锡替曲膦(TF 药盒); 含量测定

中图分类号: R927.2; R943.3 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)05-0465-03

Determination of Tetrofosmin in Tetrofosmin and Stannous Chloride for Injection (TF Kit) by HPLC

CHEN Zhiming, YU Yanhua, WU Erming(Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of tetrofosmin in tetrofosmin and stannous chloride for injection(TF kit). **METHODS** HPLC was adopted with Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm) column as analytical column, methanol-water (85:15) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 215 nm, respectively. **RESULTS** The linear range of tetrofosmin was 50–500 μg·mL⁻¹, $r=0.9998$. The average recovery was 98.09%, RSD was 0.63%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and suitable for determination of tetrofosmin in TF kit.

KEY WORDS: HPLC; tetrofosmin; TF kit; content determination

锝[^{99m}Tc]标记的替曲膦是一种新型的心肌灌注显像剂^[1-2], 经静脉注射可用于药物负荷或运动静息状态下心肌灌注显像和肿瘤显像^[3-4]。该药最早由 Amersham 公司研制, 并于 1994 年在日本和欧洲全面上市。

本品原料药及药盒由江苏省原子医学研究所参与研制^[5], 并于 2008 年 11 月在国内正式投产上

市。目前国内未见关于 HPLC 测定注射用亚锡替曲膦(TF 药盒)中替曲膦含量的文献报道。本试验建立了 HPLC 测定注射用亚锡替曲膦(TF 药盒)中替曲膦的含量。

1 仪器与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器, Breeze 化学工作站; BP211D 电子天平

作者简介: 陈志明, 男, 主管药师 Tel: (0510)85516244 E-mail: chenzhiming2002@yahoo.cn

(Sartorius); KH2200DB 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); LABCONCO 冷冻干燥机(Labconco 公司); 替曲膦对照品(自制, 批号: 0904002, 纯度: 99.8%); 乙烯基乙醚(百灵威化学试剂有限公司, 批号: A0250739, 纯度: 99.9%); 注射用亚锡替曲膦(冻干粉针, 江苏省原子医学研究所, 规格: 0.25 mg, 批号: 20091019, 20091229, 20100303)。甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: 甲醇-水(85:15); 检测波长: 215 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。理论板数按替曲膦峰计约为 3 100, 替曲膦峰与其他峰的分度为 5.6, 拖尾因子为 1.03。

2.2 对照品溶液的制备

取替曲膦对照品 25 mg, 精密称定, 置 50 mL

量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 超声处理 8 min, 放至室温, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 得替曲膦浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的标准储备溶液。

精密吸取标准储备液 5.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成替曲膦浓度为 250 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 1 瓶, 用移液枪移取 500 μL 甲醇溶液超声溶解冻干品, 用移液枪移至 1 mL 量瓶中, 用 150 μL 甲醇洗 3 次, 均加入量瓶, 再加甲醇至刻度, 超声处理 8 min, 冷却至室温, 用甲醇补足至刻度, 0.45 μm 滤膜过滤, 配成供试品溶液。

2.4 专属性考察

2.4.1 专属性试验 按处方组成, 取除替曲膦的其余组分, 按工艺要求配制无替曲膦的阴性对照液, 并冷冻干燥, 得冻干品。按“2.3”项下方法处理, 以“2.1”项下色谱条件测定, 结果在替曲膦出峰处无对应峰出现, 表明其他组分对测定无干扰。色谱图见图 1。

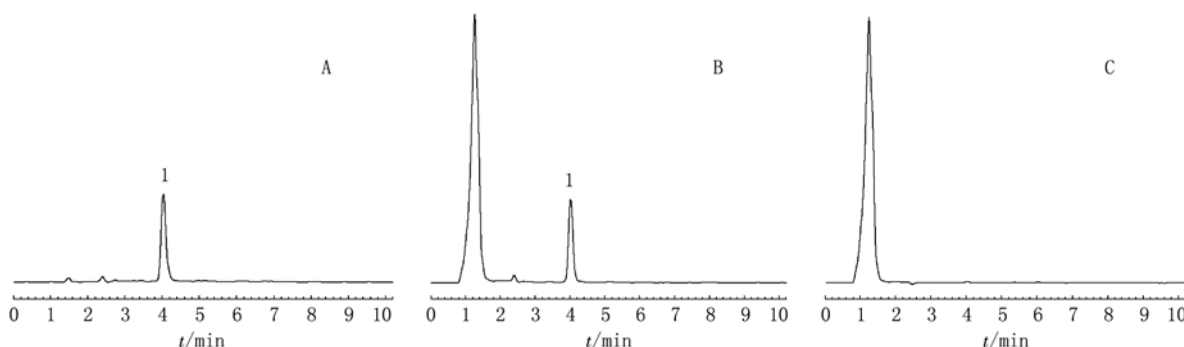


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性样品; 1-替曲膦

Fig 1 HPLC chromatogram

A-reference substance; B-sample; C-negative sample without tetrofosmin; 1-tetrofosmin

2.4.2 替曲膦与中间体的分离 根据合成工艺, 替曲膦可能引入的杂质主要是中间体乙烯基乙醚。取替曲膦对照品和乙烯基乙醚适量, 加甲醇适量使溶解并稀释制成浓度均为 250 μg·mL⁻¹ 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 中间体乙烯基乙醚保留时间为 2.6 min, 和替曲膦的分度为 5.0。结果表明在“2.1”色谱条件下替曲膦与中间体能完全分离。

2.4.3 替曲膦与分解降解产物的分离 取本品适量, 分别经光照[(4 500±500)lx, 密闭, 室温]10 d、酸(1 mol·mL⁻¹ 盐酸, 密闭, 室温, 1 mL)2 h、碱

(1 mol·mL⁻¹ 氢氧化钠溶液, 密闭, 室温, 1 mL)2 h、过氧化氢溶液(1%, 密闭, 室温, 1 mL)1 h、水浴(80 °C, 密闭, 水 1 mL)1 h 破坏处理, 中和后分别加甲醇稀释成约为 250 μg·mL⁻¹ 的供试液, 进行 HPLC 分析。结果本品在光照、酸、碱和水浴条件下比较稳定, 在氧化破坏下降解, 降解产物在“2.1”色谱条件下的保留时间为 1.5, 12.2 min, 和替曲膦的分度均>1.5。试验表明在“2.1”色谱条件下, 替曲膦与降解产物色谱峰分离良好。

2.5 线性关系考察

分别精密量取上述替曲膦标准储备液 1.0,

2.0, 3.0, 5.0, 7.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成替曲膦浓度为 50, 100, 150, 250, 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 另加上替曲膦标准储备液浓度为 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在“2.1”色谱条件下, 取 20 μL 进样分析, 以替曲膦峰面积为纵坐标(y), 浓度为横坐标(x), 进行线性回归, 得回归方程: $y=1.299\times 10^4+2.495\times 10^4x(r=0.9998)$, 线性范围 50~500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 精密度试验

取替曲膦对照品溶液, 重复进样 6 次, 替曲膦峰面积 RSD 为 0.17%, 表明仪器精密度良好。不同分析人员($n=5$)进样操作, 替曲膦峰峰面积 RSD 为 0.39%, 表明中间精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批号(20091229)的注射用亚锡替曲膦样品 5 份, 按“2.3”项下方法处理, 进样测定。结果替曲膦的平均含量为 0.232 $\text{mg}\cdot\text{瓶}^{-1}$, RSD 为 0.56%, 表明重复性良好。

2.8 稳定性试验

取替曲膦供试品溶液, 分别在室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 进样测定, 替曲膦峰面积 RSD 为 0.94%, 表明被测样品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.9 回收率试验

按处方组成, 在空白辅料中加入原料药对照品, 加入替曲膦分别为处方量的 80%, 100%和 120%, 按工艺要求配制, 并冷冻干燥, 得冻干品。

按“2.3”项下方法处理, 进样测定, 每个浓度测定 3 份, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 注射用亚锡替曲膦的加样回收率($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test($n=9$)

加入量/ mg	实测量/ mg	回收率/ %	平均 回收率/%	RSD/ %
0.200	0.196	98.1		
0.200	0.195	97.6		
0.200	0.197	98.5		
0.250	0.247	98.7		
0.250	0.243	97.3	98.1	0.63
0.250	0.245	98.1		
0.300	0.294	98.1		
0.300	0.296	98.6		
0.300	0.294	97.9		

2.10 样品测定

注射用亚锡替曲膦样品 3 批, 每个批号取 3 瓶, 按“2.3”项下方法处理, 进样测定, 以峰面积按外标法计算样品含量, 结果见表 2。

表 2 样品中替曲膦的含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of sample determination($n=3$)

批号	测得量/mg	含量/%	RSD/%
20090914	0.227	90.7	0.56
20091229	0.232	93.0	0.68
20100303	0.226	90.5	0.66

3 讨论

从替曲膦的紫外吸收图谱可见, 在 215 nm 波长附近有一最大吸收峰, 故选择 215 nm 为检测波长。在确定色谱分析条件时, 对甲醇-水的不同比例进行了多次选择比较, 最终确定以甲醇-水(85:15)为流动相, 替曲膦峰形好, 保留时间适中。

实验发现替曲膦化合物不够稳定, 甚至受空气中氧气的影响, 超过 12 h 测定峰面积有下降趋势, 回收率偏低。所以实验在暴露空气下操作尽量迅速, 并尽可能密闭操作, 以减少化合物的氧化降解。

本法操作简便, 影响因素少, 含量测定的准确度和专属性较好, 可用于 TF 药盒中替曲膦含量的快速定量分析。

REFERENCES

- [1] HIGLEY B, SMITH F W, SMITH T, et al. Technetium-99m-1,2-bis [bis (2-ethoxyethyl) phosphino] ethane: Human biodistribution, dosimetry and safety of a new myocardial perfusion imaging agent [J]. J Nucl Med, 1993, 34(1): 30-38.
- [2] KELLY J D, FORSTER A M, HIGLEY B, et al. Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging [J]. J Nucl Med, 1993, 34(2): 222-227.
- [3] HUANG D J, ZHAO F, ZHANG Y X. The clinical usefulness of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin scintigraphy in the diagnosis of lung neoplasmas and mediastinal lymphoid node involvement [J]. J Huazhong Univ Sci Technol: Med Ed(华中科技大学学报: 医学英德文版), 2008, 28(5): 608-612.
- [4] HE W, ALBERTO C. Evaluation of myocardial viability with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin after nitrate administration: comparison with FDG PET imaging [J]. Chin J Nucl Med(中华核医学杂志), 2007, 27(5): 278-281.
- [5] YU Y H, LUO S N, SHEN Y J, et al. Preparation and application of myocardial perfusion imaging agent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin [J]. J East China Univ Sci Technol: Nat Sci Ed(华东理工大学学报: 自然科学版), 2006, 32(12): 1445-1448.

收稿日期: 2010-07-19