

衍生化后紫外分光光度法测定注射用氨磷汀的含量^Δ

黄滔敏^{1*}, 陈念祖¹, 王胜资^{2#}(1.复旦大学附属眼耳鼻喉科医院药剂科, 上海 200031; 2.复旦大学附属眼耳鼻喉科医院放疗科, 上海 200031)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1596-02
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.22

摘要 目的:建立注射用氨磷汀的含量测定方法。方法:以乙酰丙酮-甲醛为衍生化试剂,硼酸-醋酸为缓冲液,将氨磷汀经衍生化后采用紫外分光光度法测定其含量,检测波长为369 nm。结果:氨磷汀检测质量浓度线性范围为0.75~5 mg/ml($r=0.999 1$),平均回收率为100.61%,RSD为1.94%($n=3$)。结论:该方法简便、快速、准确、重复性好,适用于注射用氨磷汀的含量测定。

关键词 注射用氨磷汀;紫外分光光度法;衍生化;含量测定

Content Determination of Amifostine for Injection by UV Spectrophotometry after Derivatization

HUANG Tao-min¹, CHEN Nian-zu¹, WANG Sheng-zi²(1.Dept. of Pharmacy, Otolaryngology Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China; 2.Dept. of Radiation Oncology, Otolaryngology Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of Amifostine for injection. METHODS: After derivatization of amifostine, UV spectrophotometry was selected to determine the content of amifostine based on acetylacetone-formaldehyde as derivatized reagent and boric acid-acetic acid as buffer. The detection wavelength was 369 nm. RESULTS: The linear range of amifostine was 0.75-5 mg/ml ($r=0.999 1$) with an average recovery of 100.61% (RSD=1.94%, $n=3$). CONCLUSIONS: The method is proved to be simple, rapid, accurate and reproducible, and it is suitable for the content determination of Amifostine for injection.

KEY WORDS Amifostine for injection; UV spectrophotometry; Derivatization; Content determination

氨磷汀(阿米福汀, Amifostine, 又称WR-2721), 化学名S-2-[3-氨基丙基]乙基硫代磷酸, 结构式为 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{PO}_3\text{H}_2$, 为广谱选择性细胞保护剂。其可选择性保护正常器官免受化疗、放疗的毒性攻击, 而不保护肿瘤组织, 因此, 能明显改善患者对化疗、放疗的耐受性, 提高其生活质量。1999年该药被美国FDA批准用于对抗化疗药肾毒性以及减轻肿瘤患者因放疗引起的口干症^[1]。

目前, 文献报道的氨磷汀的含量测定方法有电化学法^[2-3]、化学发光法^[4]和高效液相色谱(HPLC)-荧光柱前衍生法^[5]。这些方法所用检测器都不是实验室常配检测器, 因此适用范围有限。氨磷汀结构本身并不具有强的发光基团, 若采用HPLC-紫外检测器在检测波长210 nm附近进行测定, 选择性不高且易受到流动相及溶剂性质的影响。本试验利用氨磷汀与乙酰丙酮、甲醛衍生化生成黄色化合物二乙酰基二氢吡啶, 该衍生化产物在369 nm波长处有比较强的紫外吸收, 且测定波长处无溶剂和空白的干扰。因此可将氨磷汀经乙酰丙酮-甲醛衍生化后直接进行紫外测定。经验证, 该方法简便、快速、

结果准确、重复性好, 适用于氨磷汀的含量测定。

1 材料

UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

注射用氨磷汀样品(大连美罗大药厂, 批号: 53101001、53110201、53120403, 规格: 每瓶0.4 g); 氨磷汀对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100816-200701, 纯度: 79.9%); 乙酰丙酮、甲醛、硼酸、冰醋酸均为分析纯, 注射用水为医院自制。

2 方法与结果

2.1 标准品贮备液与供试品溶液的配制

精密称取对照品50 mg, 加注射用水溶于5 ml量瓶中, 配制成标准品贮备液。

精密称取样品适量(约相当于氨磷汀0.3 g), 置于10 ml量瓶中, 加注射用水溶解并稀释至刻度, 摇匀; 取上述溶液适量, 用注射用水稀释10倍, 作为注射用氨磷汀供试品溶液(约含氨磷汀3 mg/ml)。

2.2 衍生化反应

硼酸-醋酸缓冲液的配制: 将硼酸12.37 g和冰醋酸11.4 ml置于1 000 ml量瓶中, 加注射用水至刻度, 摇匀即可。

衍生化溶液的配制: 分别量取乙酰丙酮2.1 ml、甲醛5.6 ml, 置于100 ml量瓶中, 加上上述硼酸-醋酸缓冲液至刻度, 摇匀即可。该液临时时新鲜配制。

样品衍生化处理: 精密量取供试品溶液1 ml, 置于100 ml量瓶中, 精密加入新制的衍生化溶液3 ml, 于98~100 °C水浴

^Δ 基金项目: 上海市科学技术委员会医学引导类资助项目(No. 09411962000); 上海市浦东新区卫生局卫生科技资助项目(No. PW2009D-7)

* 主管药师, 博士研究生。研究方向: 药物分析。电话: 021-64377134-257。E-mail: 13918134861@139.com

通信作者: 教授, 主任医师。研究方向: 头颈部肿瘤的诊断和放疗。E-mail: shengziwang@yahoo.com

加热30 min,放冷,用硼酸-醋酸缓冲液稀释至刻度。

2.3 测定波长的选择

取对照品和不含主成分的空白辅料溶液进行衍生化处理,摇匀后进行紫外扫描。结果显示,在369 nm波长附近,空白辅料经同样方法处理后在此附近无吸收,故选择369 nm为测定波长,见图1。

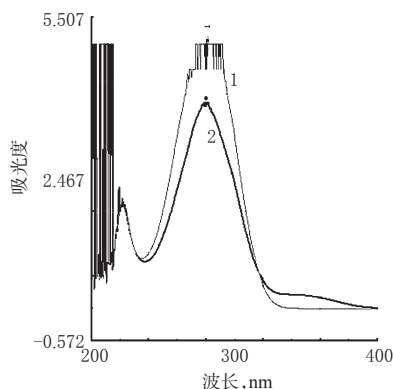


图1 紫外扫描图

1.空白辅料;2.对照品

Fig 1 UV spectrophotometry

1. blank excipient; 2. substance control

2.4 衍生化样品的标准曲线

取氨磷汀对照品贮备液适量,用注射用水稀释配制含氨磷汀0.75、1、2、3、4、5 mg/ml的系列对照品溶液,样品衍生化处理,于369 nm波长进行分光光度法测定。以氨磷汀衍生化产物的吸光度(A)为纵坐标,溶液的质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $A=0.1643c+0.09308$ ($r=0.9991$, $n=6$)。结果表明,氨磷汀检测质量浓度的线性范围为0.75~5 mg/ml。

2.5 精密度试验

取1、3、5 mg/ml的氨磷汀对照品溶液,按“2.2”项下操作,于369 nm波长处测定吸光度,同日内测定5次考察日内精密度,连续5 d各测定1次考察日间精密度。结果3种质量浓度下,日内、日间RSD分别为1.14%、0.64%、0.59%和1.12%、1.13%、0.85%($n=5$)。

2.6 重复性试验

精密称取同一批号样品5份,按“2.2”项下方法衍生化后,测定吸光度。结果,平均RSD=1.19%($n=5$),表明本方法重复性较好。

2.7 回收率试验

将对照品加入处方量的辅料中配制成含氨磷汀为1、3、5 mg/ml的样品,经衍生化处理,测定吸光度,计算回收率。结果平均回收率为100.61%,RSD=1.94%($n=3$),详见表1。

2.8 衍生化反应时间

取质量浓度为3 mg/ml的氨磷汀对照品溶液10份,每2份为一组,于98~100 °C水浴放置10、20、30、40、50 min后测定。结果,平均吸光度分别为0.342、0.458、0.516、0.515、0.517。可见,水浴30 min已使衍生化反应完全,故取30 min为衍生化反应时间。

2.9 衍生化产物的稳定性试验

取3 mg/ml氨磷汀对照品溶液置于100 ml量瓶中,加入衍

表1 回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery test($n=3$)

加入量,mg/ml	测得量,mg/ml	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
1	1.03	100.24		
1	1.02	100.85		
1	1.03	102.67		
3	3.08	101.99		
3	3.08	102.80	100.61	1.94
3	3.07	102.19		
5	4.92	98.44		
5	4.91	98.20		
5	4.90	98.08		

生化溶液3 ml,在水浴中加热30 min,冷却至室温,加硼酸-醋酸缓冲液至刻度,溶液每隔1 h测定1次。结果测定值分别为0.515、0.512、0.516、0.514、0.512,RSD=0.29%($n=5$),表明4 h内可获得稳定的测定结果。

2.10 样品含量测定

精密称取氨磷汀样品、对照品适量,按“2.1”项下方法制备成供试品、对照品溶液,再按“2.2”项下衍生化方法进行处理,在369 nm波长处分别测定吸光度。结果,3批样品氨磷汀含量分别为101.9%、100.8%、97.8%。

3 讨论

本法最大的优点是操作简便、专属性强,因为在测定波长处无空白辅料及衍生化试剂干扰,故可直接采用分光光度计进行测定;衍生化产物在4 h内稳定,无降解;测定误差小,方法的日内、日间精密度、回收率、重复性试验结果均良好。

在文献报道的氨磷汀的含量测定方法^[2-5]中,电化学法和化学发光法虽灵敏度较高,但易受杂质及其他物质的干扰;荧光胺柱前衍生法虽灵敏度较高,但需要用荧光检测器,而荧光检测器不如紫外分光光度计应用广泛。目前尚无该制剂的国家标准含量测定方法,因此研究该制剂的含量测定方法对其质量控制有着重要的意义。

参考文献

- [1] Kouvaris JR, Kouloulias VE, Vlahos LJ. Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector[J]. *Oncologist*, 2007, 12(6): 738.
- [2] Bai F, Kirstein MN, Hanna SK, et al. New liquid chromatographic assay with electrochemical detection for the measurement of amifostine and WR1065[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 772(2): 257.
- [3] Bolner A, Barbato L, Tagliaro F, et al. Determination of apomorphine in human plasma by alumina extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Forensic Sci Int*, 1997, 89(1/2): 81.
- [4] 郁丰善,蔡苹,陈芳.化学发光法测定氨磷汀研究[J]. *分析科学学报*, 2008, 24(2): 149.
- [5] 孙伟光,卢婷利,陈涛,等.高效液相色谱-荧光胺柱前衍生法测定氨磷汀微球中氨磷汀的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(14): 1 189.

(收稿日期:2012-08-14 修回日期:2012-09-25)