

# HPLC-CAD 测定羟基脲胶囊含量及有关物质

李建伟<sup>1,2</sup>, 汪敏<sup>2</sup>, 杨伟秋<sup>2</sup>, 严小燕<sup>2</sup>(1.长治医学院药学院, 山西 长治 046000; 2.北京振东光明药物研究院有限公司, 北京 100080)

**摘要:** 目的 建立测定羟基脲胶囊含量及有关物质检查的 HPLC-CAD 方法。方法 采用 Phenomenex Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 10 μm, 100Å), 柱温为 40 °C; 以乙腈-水(82 : 18)为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测器为电雾式检测器, 雾化温度 50 °C, 进样量 10 μL。结果 在选定的色谱条件下, 主峰与各杂质峰均能良好分离。采用外标法计算羟基脲胶囊的含量, 采用主成分自身对照法计算脲的含量; 羟基脲和脲分别在 0.304 8~1.270 0 mg·mL<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8)、0.241 1~1.004 6 mg·mL<sup>-1</sup>(*r*=1.000 0)内与峰面积呈良好线性关系。脲的检测限和定量限分别为 2.82 ng 和 8.46 ng。结论 本方法操作简便, 专属性强, 结果可靠, 可用于羟基脲胶囊的含量及有关物质的测定。

**关键词:** 羟基脲胶囊; 有关物质; 含量; 脲

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)20-2568-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.20.016

引用本文: 李建伟, 汪敏, 杨伟秋, 等. HPLC-CAD 测定羟基脲胶囊含量及有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(20): 2568-2571.

## Determination of the Content and the Related Substances of Hydroxycarbamide Capsules by HPLC-CAD

LI Jianwei<sup>1,2</sup>, WANG Min<sup>2</sup>, YANG Weiqiu<sup>2</sup>, YAN Xiaoyan<sup>2</sup>(1. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. Beijing Zhendong Guangming Drug Research Institute Co., Ltd., Beijing 100080, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC-CAD method for determination of the content and the related substances of hydroxycarbamide capsules. **METHODS** The determination was carried out on a Phenomenex Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub>(250 mm×4.6 mm, 10 μm, 100Å) column at 40 °C, with acetonitrile-water(82 : 18) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detector of charged aerosol detection was applied with a high nebulization temperature at 50 °C, the injection volume was 10 μL. **RESULTS** Under the selected chromatographic conditions, related substances were completely separated from the principal component. The content of hydroxycarbamide capsules was calculated by the external standard method of the reference substance, and the content of carbamide was calculated by the self-control method of the main component. Hydroxycarbamide and carbamide showed a good linear relationship with the peak area in the concentration range of 0.304 8–1.270 0 mg·mL<sup>-1</sup> (*r*=0.999 8) and 0.241 1–1.004 6 mg·mL<sup>-1</sup>(*r*=1.000 0), respectively. The detection limits and quantitation limits of carbamide were 2.82 ng and 8.46 ng, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, specific and reliable, and can be used for the determination of the content of hydroxycarbamide capsules and related substances.

**KEYWORDS:** hydroxycarbamide capsule; related substance; content; carbamide

羟基脲(又名氨基甲酰基羟胺)为核糖核苷酸还原酶抑制剂类抗肿瘤药物, 可干扰嘌呤及嘧啶碱基生物合成, 选择性地阻碍 DNA 合成, 对 RNA 及蛋白质合成无阻断作用。本品主要用于治疗慢性粒细胞白血病, 马里兰耐药的慢性粒细胞白血病; 对黑色素瘤、骨癌、头颈部癌治疗有一定疗效, 与放疗联合对头颈部及宫颈鳞癌治疗有效。

中国药典 2020 年版收载了羟基脲原料和羟基脲片<sup>[1]</sup>, 未收载羟基脲胶囊; 欧洲药典 8.0 版收载了羟基脲原料<sup>[2]</sup>; 美国药典 42 版收载羟基脲原料和羟基脲胶囊<sup>[3]</sup>。现行的各国标准和文献<sup>[4-6]</sup>中, 均分别采用反相 HPLC-UV 检测羟基脲的含量和

有关物质, 并且采用薄层色谱法(TLC)进行工艺杂质(脲)的检测。羟基脲和脲的结构式见图 1。由于羟基脲极性大, 反相色谱柱保留弱, 只在短波长范围内有紫外吸收, 很容易受到制剂辅料干扰。采用 TLC 对有关物质进行检查, 操作复杂, 重现性差, 分析时间太长, 灵敏度低, 无法准确定量。电雾式检测器(CAD)是一种新型原理的、高灵敏度、重现性较好的通用型检测器<sup>[7]</sup>, 可以对无紫外吸收的药物活性成分<sup>[8]</sup>或药用辅料<sup>[9]</sup>进行检测。本研究针对羟基脲及其杂质极性较强, 无紫外吸收的问题, 采用 HPLC-CAD 对其进行分离检测, 建立羟基脲与降解杂质脲的测定方法。

作者简介: 李建伟, 男, 硕士, 副教授 Tel: (0355)3151463

E-mail: lyy7273@163.com

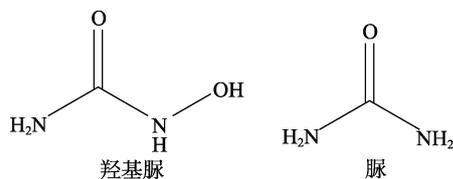


图1 羟基脲和脲结构式

Fig. 1 Chemical structure of hydroxycarbamide and carbamide

## 1 仪器与试剂

U3000 高效液相色谱仪 (ThermoFisher Scientific); Corona veo 电雾式检测器(赛默飞世尔科技公司)。羟基脲胶囊(山西振东安特生物制药有限公司, 批号: 180702; 规格: 250 mg); 羟基脲胶囊(美国施贵宝, 批号: 5L03634; 规格: 500 mg); 羟基脲原料(齐鲁天和惠世制药有限公司, 批号: AM110315041); 羟基脲对照品(批号: 101192-201402; 含量: 99.8%)、脲对照品(批号: 100288-201302; 含量: 100%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Phenomenex Luna<sup>®</sup> NH<sub>2</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 10 μm, 100Å); 流动相为乙腈-水(82 : 18), 柱温为 40 °C, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 等度洗脱, 进样量 10 μL。CAD 检测器采集频率: 5 Hz, 干燥管蒸发温度: High(50 °C); Filter: 3.6 s; Power Function: 1.00。

### 2.2 溶液的制备

系统适用性溶液: 精密称取羟基脲、盐酸羟胺和脲对照品适量, 加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 含羟基脲、盐酸羟胺和脲分别为 5, 1, 2 mg 的溶液, 作为系统适用性溶液。

含量供试品溶液: 精密称取羟基脲胶囊内容物适量(约相当于羟基脲 25 mg), 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声使溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为含量供试品溶液。

对照品溶液: 精密称取羟基脲对照品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声使溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

有关物质供试品溶液: 精密称取羟基脲胶囊内容物适量(约相当于羟基脲 50 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声使溶解, 用流动相稀释至

刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为有关物质供试品溶液。

有关物质对照溶液: 精密量取有关物质供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.3 专属性试验

**2.3.1 系统适用性试验** 精密吸取系统适用性溶液及空白辅料溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图(见图 2), 结果表明, 溶剂和辅料对羟基脲主峰无干扰, 盐酸羟胺和脲与羟基脲主峰之间均能有效分离, 分离度>1.5, 以羟基脲色谱峰计算理论板数>5 000, 拖尾因子<1.2。

**2.3.2 强制破坏试验** 精密称取羟基脲胶囊内容物适量(约相当于羟基脲 50 mg), 置 10 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声使溶解, 经过酸(1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 1 mL, 100 °C 放置 1.5 h)、碱(1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 1 mL, 100 °C 放置 30 min)、氧化(10% 双氧水 1 mL, 放置 2 h)破坏后, 冷却至室温, 加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液或 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调节至中性, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取过滤溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。光照破坏试验取羟基脲胶囊内容物适量(约相当于羟基脲 50 mg), 在 5 000 lux 光照强度下放置 10 d, 其余操作方式相同。

结果显示, 羟基脲在高温、强碱和氧化条件下不稳定, 容易降解产生脲及其他杂质; 在光照和酸性条件下较为稳定; 羟基脲胶囊中的辅料在酸破坏条件下容易降解成其他杂质。盐酸羟胺属于工艺杂质, 原料和样品中均未检出。

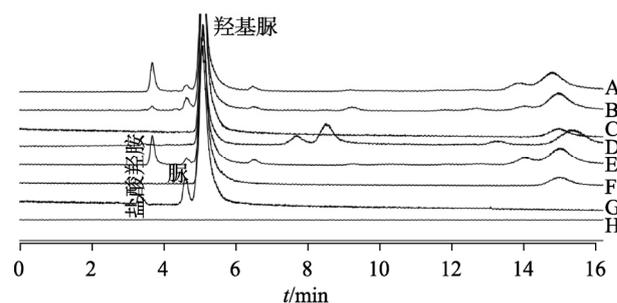


图2 不同降解条件下的 HPLC 色谱图

A-碱破坏溶液; B-氧化破坏溶液; C-光破坏溶液; D-酸破坏溶液; E-高温破坏溶液; F-未破坏溶液; G-系统适用性溶液; H-空白辅料溶液。

Fig. 2 HPLC chromatograms of various degradation conditions

A-alkaline stress solution; B-oxidative stress solution; C-UV stress solution; D-acid stress solution; E-heat stress solution; F-original solution; G-system suitability solution; H-blank excipient solution.

## 2.4 线性范围考察

精密称取羟基脲对照品适量, 配制不同浓度的羟基脲对照品溶液, 以羟基脲峰面积( $Y$ )为纵坐标, 对照品溶液浓度( $X$ )为横坐标, 绘制工作曲线, 得到回归方程:  $Y=32.369X+0.2581$ ,  $r=0.9998$ , 羟基脲在  $0.3048\sim 1.2700\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系。

精密称取脲对照品适量, 配制不同浓度的脲对照品溶液, 以脲峰面积( $Y$ )为纵坐标, 对照品溶液浓度( $X$ )为横坐标, 绘制工作曲线, 得到回归方程:  $Y=39.46X-0.1486$ ,  $r=1.0000$ , 脲在  $0.2411\sim 1.0046\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系。

精密称取盐酸羟胺对照品适量, 配制不同浓度的盐酸羟胺对照品溶液, 以盐酸羟胺峰面积( $Y$ )为纵坐标, 对照品溶液浓度( $X$ )为横坐标, 绘制工作曲线, 得到回归方程:  $Y=60.0027X-0.0073$ ,  $r=0.9998$ , 盐酸羟胺在  $0.0025\sim 0.0198\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系。

由脲、羟基脲与盐酸羟胺的线性回归方程斜率可知, 脲与羟基脲的响应在  $0.8\sim 1.2$  内, 盐酸羟胺与脲的响应不在  $0.8\sim 1.2$  内, 所以羟基脲胶囊中脲的可以采用主成分自身对照法进行计算, 盐酸羟胺可以采用外标法进行计算。

## 2.5 重复性试验

按“2.1”项下色谱条件, 分别平行测定 6 份样品含量供试品溶液和 6 份样品的有关物质供试品溶液, 考察方法重复性。结果 6 份样品平均含量为  $100.07\%$ , RSD 值为  $0.26\%$ ; 6 份样品中均未检出脲, 单个最大杂质和总杂的变化均  $<0.05\%$ 。表明该方法重复性良好。

## 2.6 检测限和定量限

取“2.4”项下羟基脲和脲对照品溶液, 分别逐步稀释进样测定, 按信噪比( $S/N$ )约为  $3:1$  计算, 羟基脲、脲和盐酸羟胺的检测限分别为  $2.19\text{ ng}$ (约相当于供试品浓度的  $0.002\%$ )、 $2.82\text{ ng}$ (约相当于供试品浓度的  $0.003\%$ )和  $14.89\text{ ng}$ (约相当于供试品浓度的  $0.015\%$ )。按信噪比( $S/N$ )约为  $10:1$  计算, 羟基脲、脲和盐酸羟胺的定量限分别为  $6.57\text{ ng}$ (约相当于供试品浓度的  $0.007\%$ )、 $8.46\text{ ng}$ (约相当于供试品浓度的  $0.008\%$ )和  $49.62$ (约相当于供试品浓度的  $0.050\%$ )。

## 2.7 回收率试验

配制 3 个浓度共 9 份回收率样品溶液( $80\%$ ,  $100\%$ ,  $120\%$ ), 考察回收率, 结果见表 1, 在

$80\%\sim 120\%$  平均回收率为  $99.47\%$ , RSD 值为  $0.65\%$ , 表明本法回收率良好。

表 1 羟基脲回收率试验结果

Tab. 1 Recovery result of hydroxyurea %

名称	回收率	平均回收率	RSD
80%-1	99.62		
80%-2	100.12		
80%-3	98.90		
100%-1	100.10		
100%-2	99.91	99.47	0.65
100%-3	100.00		
120%-1	98.84		
120%-2	98.34		
120%-3	99.36		

有关物质供试品溶液中添加限度浓度为  $80\%$ ,  $100\%$  和  $150\%$  的脲, 平行配制 3 个浓度共 9 份, 考察回收率, 结果见表 2, 在  $80\%\sim 150\%$  内平均回收率为  $99.59\%$ , RSD 值为  $1.17\%$ , 表明本法回收率良好。

表 2 脲回收率试验结果

Tab. 2 Recovery results of urea %

名称	回收率	平均回收率	RSD
80%-1	98.84		
80%-2	97.45		
80%-3	99.90		
100%-1	99.43		
100%-2	101.00	99.59	1.17
100%-3	98.89		
150%-1	99.39		
150%-2	101.22		
150%-3	100.17		

有关物质供试品溶液中添加限度浓度为  $80\%$ ,  $100\%$  和  $150\%$  的盐酸羟胺, 平行配制 3 个浓度共 9 份, 考察回收率, 结果见表 3, 在  $80\%\sim 150\%$  内平均回收率为  $100.15\%$ , RSD 值为  $1.62\%$ , 表明本法回收率良好。

## 2.8 溶液稳定性试验

称取羟基脲胶囊内容物适量, 分别配制约含羟基脲  $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液, 滤过, 即得有关物质和含量供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别于  $0, 2, 4, 6, 8$  和  $12\text{ h}$  进样, 记录色谱图, 并与  $0\text{ h}$  对比。结果  $12\text{ h}$  内杂质无明显变化, 含量变化在  $\pm 1\%$  以内, 所以有关物质和含量供试品溶液在  $12\text{ h}$  内稳定。

表3 盐酸羟胺回收率试验结果

Tab. 3 Recovery test results of hydroxylamine hydrochloride

名称	回收率	平均回收率	RSD
80%-1	98.13		
80%-2	100.27		
80%-3	99.01		
100%-1	100.79		
100%-2	98.09	100.15	1.62
100%-3	101.97		
150%-1	102.91		
150%-2	99.78		
150%-3	100.37		

## 2.9 耐用性试验

取羟基脲和脲的混合对照品溶液,分别调整流动相乙腈-水的比例(80:20, 82:18, 84:16)、柱温(35, 40, 45 °C)和流速(0.9, 1.0, 1.1 mL·min<sup>-1</sup>),考察羟基脲和脲的分离度及拖尾因子情况。结果表明,拖尾因子均<1.2,羟基脲与脲色谱峰间分离度均>1.5,方法耐用性良好。

## 2.10 样品测定

按“2.1”项下色谱条件,取3批自制样品和1批参比制剂,分别测定含量和有关物质。3批自制样品和1批参比制剂中均未检出脲,单杂和总杂含量均<0.1%;3批自制样品和1批参比制剂的含量分别为98.65%, 99.24%, 98.47%和97.89%。

## 3 讨论

国内外药典和文献大部分采用C<sub>18</sub>色谱柱对羟基脲有关物质进行分离,也有学者采用亲水色谱柱对羟基脲片有关物质进行测定。由于羟基脲和脲均为极性较强化合物,在C<sub>18</sub>和亲水色谱柱上保留弱,导致出峰时间早,难以与制剂中的乳糖等极性辅料有效分离。Phenomenex Luna<sup>®</sup>NH<sub>2</sub>柱可在反相模式下对极性和中等极性化合物进行有效分离,经过试验对比,采用该柱可以有效分离羟基脲和脲以及制剂辅料。

中国药典2020年版和欧洲药典8.0版对羟基脲含量的检测采用C<sub>18</sub>色谱柱,流动相为甲醇-水(5:95)。美国药典42版以四丁基硫酸氢铵缓冲液-甲醇(85:15)为流动相。本试验通过对不同比例的乙腈-水(80:20, 82:18, 84:16)流动相进行优化筛选,确认乙腈-水在80:20~84:16时,羟基脲与杂质峰之间的分离度均符合要求,选定流动相为腈-水(82:18)。

在各国药典中,羟基脲原料有关物质检查

采用盐酸羟胺和羟基脲溶液作为系统适用性溶液,在羟基脲胶囊中,在选定色谱条件下,盐酸羟胺和填充剂乳糖有干扰,脲是羟基脲的降解杂质,因此,采用脲和羟基脲溶液作为羟基脲胶囊的系统适用性溶液来考察系统分离度。由于盐酸羟胺为羟基脲合成起始物料,因此,在羟基脲原料中采用盐酸羟胺和羟基脲溶液作为系统适用性溶液,可以控制原料中的工艺杂质。

在选定的色谱条件下,通过强制降解试验,可以检出羟基脲在高温、强碱和氧化条件下产生的降解杂质,包括脲和另外一个未知杂质,在碱性和氧化条件下,未知杂质更加明显,有必要对其进行深入研究,通过质谱分析确定其结构,考虑将其列入杂质控制指标。另外,羟基脲胶囊中的辅料在酸破坏条件下容易降解成其他杂质,辅料降解产生的杂质色谱峰峰型与羟基脲降解杂质不同。

本研究采用高效、快速、专属性强的HPLC-CAD测定羟基脲胶囊的含量和有关物质,成功分离了羟基脲及其杂质,并建立了脲的液相检测法。该法专属性强,准确度高,可用于羟基脲胶囊的质量控制。

该方法优于现有药典标准,能将强极性无保留的羟基脲和脲及盐酸羟胺有效分离,并且可以替换传统的TLC检测杂质脲。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2020: 1468-1469.
- [2] EP 8.0[S]. 2017: 2720-2721.
- [3] UP42-NF37[S]. 2018: 4538-4539.
- [4] LI L, ZHU Y J, ZHANG Y Y, et al. Quality evaluation and analysis of hydroxycarbamide tablets and capsules[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2016, 30(11): 1091-1095.
- [5] XU Y W, LIU D S. HPLC and TLC determination of related substances in hydroxycarbamide and its tablets[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(12): 2385-2387.
- [6] 李立, 丁大中, 张磊. 快速液相色谱法测定羟基脲片的有关物质[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(20): 3589-3590.
- [7] LIU L, GAO X, YANG Y J. Application of HPLC-charged aerosol detection[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2012, 43(3): 227-231.
- [8] LI M, HOU J F, LU Y, et al. Determination of the related substances and kanamycin contents in kanamycin sulfate and its injection by an HPLC-CAD method[J]. Chin J Antibiot(中国抗生素杂志), 2018, 43(3): 341-347.
- [9] SUN Y F, ZHAO X, ZHANG M, et al. Determination of lactose and its related substances by HPLC-CAD[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(5): 894-901.

收稿日期: 2020-11-15

(本文责编: 沈倩)