

HPLC 测定硫唑嘌呤片有关物质

匡荣^{1,2}, 陈男¹, 倪维芳²(1.浙江工业大学药学院 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法测定硫唑嘌呤片有关物质。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.05%醋酸钠溶液(18:82)为流动相, 流速为 1.2 mL·min⁻¹, 检测波长为 300 nm。结果 硫唑嘌呤片中的 2 个典型杂质 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的线性范围均为 0.125~1.80 μg·mL⁻¹(*r* 分别为 0.999 7 和 0.999 9), 检出限分别为 0.787 ng 和 0.933 ng, 平均回收率为 100.3%(RSD=0.64%)和 100.0%(RSD=0.14%)。结论 高效液相色谱法测定硫唑嘌呤片有关物质简便、快速, 测定结果准确、可靠。

关键词: 硫唑嘌呤片; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0180-04

HPLC Determination of the Related Substances in Azathioprine Tablets

KUANG Rong^{1,2}, CHEN Nan¹, NI Weifang²(1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of related substances in Azathioprine Tablets. **METHODS** The C₁₈ column (200 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol and 0.05% of sodium acetate solution(18:82) at the flow rate of 1.2 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 300 nm. **RESULTS** The linear ranges of the two typical related substances mercaptopurine and 5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole in Azathioprine Tablets were all 0.125~1.80 μg·mL⁻¹(*r*=0.9997 and 0.9999) with the detection limits of 0.787 ng and 0.933 ng, and the average recoveries were 100.3% and 100.0% with the RSD of 0.64% and 0.14%. **CONCLUSION** The method proposed for determining the related substances of Azathioprine Tablets is simple, quick and the result is accurate and specific.

KEY WORDS: Azathioprine Tablets; related substance; HPLC

硫唑嘌呤是 20 世纪 60 年代问世的免疫抑制剂, 为 6-巯基嘌呤的咪唑衍生物, 临床上主要用于器官移植时抑制排斥反应和多系统的自身免疫性疾病, 如系统性红斑狼疮等^[1]。硫唑嘌呤片除在中国药典 2005 年、2010 年版二部收载外, 在英国药典 2010 年版、美国药典 33 版和日本药局方 15 版中也有收载, 但中国药典 2005 年版二部, 美国药典 33 版和日本药局方 15 版中均无“有关物质”检查项, 英国药典 2010 年版和我国进口药品注册标准 JX20010317 中均用 TLC 法控制 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的量为 1%, 中国药典 2010 年版二部增订“有关物质”项, 用反相高效液相色谱法控制有关物质的量。本实验详细报道其研究过程, 以加深对该项目的认识、并合理使用药典、保证药品的安全有效。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), SPD-M10A 二极管阵列检测器。硫唑嘌呤片

[上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂, 批号: 061201, 070801, 071201, 规格: 50 mg; 北京嘉林药业股份有限公司, 批号: 071101, 规格: 100 mg]。硫唑嘌呤对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100197-200602, 纯度: 99.3%); 6-巯基嘌呤对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100039-200602, 纯度: 89.4%), 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑对照品(Acros 公司生产, 浙江诚意药业有限公司提供, 批号: A019853, 纯度: 99.9%); 甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 甲醇-0.05%醋酸钠溶液(18:82); 流速: 1.2 mL·min⁻¹; 检测波长: 300 nm; 进样体积: 20 μL。

2.2 专属性试验

2.2.1 原料与杂质的分离效能分析 根据硫唑嘌呤

作者简介: 匡荣, 男, 博士, 副主任药师, 硕士 Tel: 13989899796 E-mail: kuangrong@zjyj.org.cn

呤原料生产工艺, 硫唑嘌呤中可能含有中间体 6-巯基嘌呤、5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑。取硫唑嘌呤和 6-巯基嘌呤、5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑适量, 用流动相制成混合溶液, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 在上述色谱条件下硫唑嘌呤与 6-巯基嘌呤、5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑能获得较好的分离。

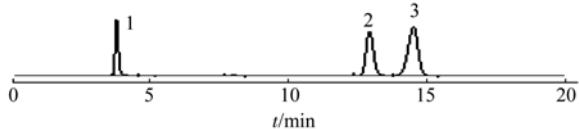


图 1 硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑分离度色谱图

1-6-巯基嘌呤; 2-5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑; 3-硫唑嘌呤

Fig 1 HPLC chromatogram of resolution for azathioprine, mercaptopurine and nitroimidazole

1-mercaptopurine; 2-nitroimidazole; 3-azathioprine

2.2.2 破坏试验 取本品(070801)20 片, 精密称定, 研细, 称取细粉 5 份(约相当于硫唑嘌呤 25 mg), 置 5 个 100 mL 量瓶中, 其中 3 瓶各加入 DMSO 3.0 mL 溶解后, 第 1 瓶加入 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL, 室温放置 24 h, 作为酸破坏供试品溶液; 第 2 瓶加入 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 室温放置 24 h, 作为碱破坏供试品溶液; 第 3 瓶加入 10%过氧化氢溶液 5 mL, 摇匀, 80 °C 水浴加热 1 h, 放冷, 作为氧化破坏供试品溶液; 第 4 瓶置 4 500 Lx 下光照 7 d, 加入 DMSO 3.0 mL 使溶解, 作为光破坏供试品溶液; 第 5 瓶置 100 °C 恒温放置 24 h, 放冷, 加 DMSO 3.0 mL 使溶解, 作为热破坏供试品溶液。将上述酸、碱供试品溶液分别中和后用流动相稀释至刻度, 其余溶液用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取滤液作为供试品溶液, 各进样 20 μL 。此外, 同时取处方量的辅料, 加 DMSO 3.0 mL, 同法进行酸、碱和氧化破坏后进样。结果表明, 本品经高温、强酸、强碱、氧化和光照破坏均有不同程度的降解, 高温和光照条件下降解相对较少, 主要产物为 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑, 酸破坏条件下主要降解产物为 6-巯基嘌呤, 碱和氧化条件下的主要降解产物为相对保留时间为 0.35 的未知杂质, 各降解产物与主成分峰均能达到基线分离, 色谱图显示降解产物峰大多在硫唑嘌呤峰前流出, 硫唑嘌呤峰保留时间 2 倍处的色谱图未见其他杂质峰, 表明色谱记录时间为 2 倍的主峰保留时间比较适宜, 见图 2。

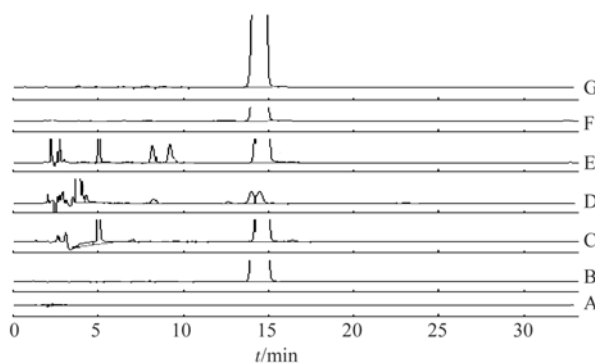


图 2 硫唑嘌呤片破坏性试验色谱图

A-空白辅料; B-未破坏样品; C-酸破坏; D-碱破坏; E-氧化破坏; F-高温破坏; G-光照破坏

Fig 2 HPLC chromatograms of destruction test for Azathioprine Tablets

A-blank excipient; B-undestructed sample; C-destroyed by acid; D-destroyed by alkali; E-destroyed by oxidation; F-destroyed by high temperature; G-destroyed by light

2.2.3 定量限和检出限 本方法以信噪比为 10 : 1 时相应量为定量限, 信噪比为 3 : 1 时相应量为检出限, 试验表明: 6-巯基嘌呤定量限为 2.242 ng, 检出限为 0.787 ng, 6 次试验的 RSD 分别为 8.4% 和 9.7%; 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑定量限为 2.581 ng, 检出限为 0.933 ng, 6 次试验的 RSD 分别为 8.7% 和 8.6%。

2.3 线性关系考察

用 6-巯基嘌呤对照品和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑对照品制成约为 1.80, 1.2, 0.6, 0.5, 0.25, 和 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准系列溶液(相当于杂质含量为 0.75%~0.05%)。按“2.1”项下色谱条件作线性试验, 记录色谱图, 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的峰面积(A)和浓度(C)呈良好线性关系。结果, 6-巯基嘌呤在 0.125~1.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内回归方程为 $A=15.433C-0.1484$, $r=0.9997$; 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑在 0.125~1.80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内回归方程为 $A=27.91C+0.2427$, $r=0.9999$ 。

2.4 仪器精密度试验

取 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑浓度各约为 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测试其精密度, 6-巯基嘌呤的平均峰面积为 18.70, RSD 为 0.64%($n=6$); 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑平均峰面积为 34.03, RSD 为 0.14%($n=6$)。

2.5 稳定性试验

取 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑浓度各约为 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 在 0, 12, 24 h 进样测定峰面积, 6-巯基嘌呤峰面积的 RSD 为

0.93%，5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑峰面积的 RSD 为 0.91%，说明两种溶液在该浓度下 24 h 内比较稳定。

2.6 回收率试验

取 6-巯基嘌呤对照品和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑对照品制成对照品溶液，精密量取适量，加入硫唑嘌呤供试品溶液(250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中，使其含量各为 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (相当于 0.5%)的 80%~120%，在上述色谱条件下，作回收率试验，结果为 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的回收率分别为 99.1%~102.6%、98.4%~102.9%，平均回收率分别为 100.3%和 100.0%，表明该方法准确可行。结果见表 1 和表 2。

表 1 6-巯基嘌呤回收率试验数据

Tab 1 Results of recovery test for mercaptopurine

加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.11	10.04	99.3		
12.64	12.53	99.1	100.3	0.64
15.17	15.56	102.6		

表 2 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑回收率试验数据

Tab 2 Results of recovery test for nitroimidazole

加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.06	9.90	98.4		
12.57	12.41	98.7	100.0	0.14
15.08	15.51	102.6		

2.7 耐用性试验

用含有 6-巯基嘌呤、硝基咪唑和硫唑嘌呤的溶液，按“2.1”项下色谱条件，做如下耐用性试验：不同生产厂家的 ODS 色谱柱比较，各色谱柱下 6-巯基嘌呤、硝基咪唑和硫唑嘌呤均能很好分离，相邻两色谱峰的分度均大于 2.0；不同比例流动相的比较，调节流动相甲醇-0.05%醋酸钠溶液中甲醇比例，使比例分别为 17:83、18:82、19:81，随着甲醇浓度的增加，主峰和各有关物质的保留时间各有不同程度地缩短，相对保留时间随之变化，但理论板数和主峰与硝基咪唑峰的分度仍能满足有关物质检查要求；不同浓度醋酸钠溶液的比较，将流动相中醋酸钠溶液浓度在一定范围内调节(0.04%~0.06%)，试验表明在此浓度范围内并不明显改变色谱峰保留时间，主峰与硝基咪唑峰的分度基本不变；不同柱温的比较，设计不同的柱温(30, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$)进行试验，随着柱温的升高，主峰和各有关物质的保留时间各有不同程度地缩短，相对保留时间随之变化，但理论板

数和主峰与硝基咪唑峰的分度仍能满足有关物质检查要求；不同流速的比较，设计不同的流速(1.0, 1.2, 1.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)进行试验，随着流速的增加，主峰和各有关物质的保留时间各有不同程度地缩短，相对保留时间随之变化，但理论板数和主峰与硝基咪唑峰的分度仍能满足有关物质检查要求。

2.8 有关物质测定

取本品 20 片，精密称定，研细，精密称取适量(约相当于硫唑嘌呤 25 mg)，置 100 mL 量瓶中，加 DMSO 3 mL 使溶解，再加流动相稀释制成每 1 mL 中约含 250 μg 的溶液，滤过，取滤液作为供试品溶液；精密量取供试品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液；取 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑浓度各约为 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别作为对照品溶液 A 和 B。按“2.1”项下色谱条件测定，取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪，调节检测灵敏度，使主成分色谱峰的峰高为满量程的 20%~25%，再精密量取供试品溶液、对照溶液和对照品溶液 A、B 各 20 μL 分别注入液相色谱仪，记录色谱图至供试品溶液主成分峰保留时间的 2 倍。供试品溶液色谱图中如显 6-巯基嘌呤峰与 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑峰，其峰面积分别不得大于对照品溶液 A、B 的主峰面积的 0.5%，其他各杂质峰面积之和不得大于对照溶液主峰面积的 0.5%。测定结果见表 3。

表 3 硫唑嘌呤片有关物质测定结果

Tab 3 The result of related substances test in Azathioprine Tablets

批号	有关物质/%		
	6-巯基嘌呤	硝基咪唑	其他杂质
071101	<0.1	<0.1	0.3
061201	<0.1	<0.1	0.1
070801	<0.1	<0.1	0.1
071201	<0.1	<0.1	0.1

3 讨论

3.1 该项目增订的必要性

中国药典 2005 年版二部硫唑嘌呤片项下没有“有关物质”检查项，美国药典 33 版和日本药局方 15 版中亦无有关物质检查项，但英国药典 2010 年版和我国进口药品注册标准 JX20010317 中有此检查项。由于 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑既是硫唑嘌呤合成的原料，根据原料药的破坏

性试验结果,也是硫唑嘌呤的分解产物,虽然在硫唑嘌呤原料中对有关物质进行了控制,但为了防止片剂在储藏、运输过程中主药分解,因此笔者认为,有必要在片剂中增订此项目。

3.2 方法和限度的确定

英国药典 2010 年版和我国进口药品注册标准 JX20010317 中均用 TLC 法同时控制 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑的量,限度均为 1.0%,中国药典 2005 年版二部硫唑嘌呤原料中用 HPLC 控制 6-巯基嘌呤和其他杂质,限度均为 0.5%^[2]。庄建芬等用 HPLC 同时检测硫唑嘌呤原料中的 6-巯基嘌呤和 5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑^[3],色谱条件与中国药典 2005 年版基本一致,但其检测波长为 240 nm,与中国药典 2005 年版所用的 300 nm 波长不

同。为了保持标准的先进性和连贯性,中国药典 2010 年版选用 2005 年版原料药“有关物质”的色谱条件同时控制硫唑嘌呤片中 6-巯基嘌呤、5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑和其他杂质的量,限度均为 0.5%。方法简便、快速、测定结果准确、可靠,限度比国外药典标准更严。

REFERENCES

- [1] Ch.P. Drug Knowledge for Clinical Use(中华人民共和国药典临床用药须知) [S]. 2005: 802.
- [2] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 年版, 第二部) [S]. 2005: Appendix 717.
- [3] ZHUANG J F, ZENG H Q. Determination of related substance in Azathioprine by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(5): 446-448.

收稿日期: 2012-12-18

HPLC-ELSD 测定丹参提取物中的单糖和二糖

牛涛¹, 徐波¹, 陈红¹, 高阳²(1.天津天士力现代中药资源有限公司, 天津 300402; 2.中国药科大学, 南京 210009)

摘要:目的 建立一种以高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)对丹参提取物中单糖和二糖进行测定的方法。方法 使用 PrevailTM Carbohydrate ES 色谱柱,以乙腈和水为流动相,梯度洗脱,柱温为 35 °C,流速为 0.8 mL·min⁻¹; ELSD 漂移管温度为 60 °C,载气为空气,气压为 25 psi。结果 丹参提取物中单糖和二糖组分能够得到较好的分离,葡萄糖、果糖和蔗糖的线性范围分别为 0.246~1.230, 0.236~1.182, 0.246~1.230 mg; 平均加样回收率($n=6$)分别为 101.7%(RSD=1.6%)、102.0%(RSD=1.0%)和 100.8%(RSD=0.9%)。结论 该方法快速简便、结果准确稳定,适合于丹参提取物中单糖、双糖的含量测定。

关键词: 丹参提取物; 高效液相色谱-蒸发光散射; 单糖; 二糖

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0183-04

Determination of Monosaccharide and Disaccharide in Tanshinon Extract by HPLC-ELSD

NIU Tao¹, XU Bo¹, CHEN Hong¹, GAO Yang²(1.Tianjin Tasly Modern TCM Resources CO., LTD, Tianjin 300402, China; 2.China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE An HPLC-ELSD method was established for the simultaneous quantitative analysis of monosaccharide, disaccharide from Tanshinon extract. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on PrevailTM Carbohydrate ES column using a mobile phase composed of a mixture of acetonitrile and water by gradient elution at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The ELSD drift tube temperature was set at 60 °C and the carrying gas was air. **RESULTS** Monosaccharides and disaccharides from Tanshinon extract could be well separated, and the linear ranges of fructose, glucose and sucrose were 0.246~1.230 mg, 0.236~1.182 mg and 0.246~1.230 mg. The average spiked recoveries($n=6$) of fructose, glucose and sucrose were 101.7%(RSD=1.6%), 102.0%(RSD=1.0%) and 100.8%(RSD=0.9%). **CONCLUSION** This method is accurate, rapid, simple and reproducible, and thus it is suitable for the determination of monosaccharides, disaccharides from Tanshinon extract.

KEY WORDS: Tanshinon extract; HPLC-ELSD; monosaccharide; disaccharide

作者简介: 牛涛, 男, 主管药师 Tel: (022)86342260 E-mail: nthomas@163.com