

高效液相色谱法分析硫唑嘌呤

谢旭一

(浙江省药品质量监测站, 杭州 3100012)

硫唑嘌呤(I)系^{6-巯基嘌呤(II)}的衍生物,是一类免疫抑制剂。主要用于异体移植时抑制免疫排斥,对自发性免疫性疾病如全身性红斑狼疮、类风湿关节炎也有缓解症状作用。国内合成路线多为:以草酸二乙酯为原料,经甲胺氨解,环合生成5-氯-1-甲基咪唑,酸中硝化生成5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑(硝化物Ⅲ),再与硫嘌呤在碱性介质中缩合反应生成硫唑嘌呤。中国药典和英美药典均用薄层色谱法检查硫唑嘌呤中6-巯基嘌呤或硝化物Ⅲ,限量规定分别为不得过1%。本文用HPLC法有效地将硫唑嘌呤中各有关杂质完全分离,采用外标法同时检查硫唑嘌呤中总杂质质量和单一杂质质量。方法准确、可靠。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:Waters公司510型泵,991型紫外二极管阵列检测器,U6K进样阀,色谱柱4×300mm YWG C₁₈(10μm)(中科院大连化物所)

硫唑嘌呤,6-巯基嘌呤标准品(Sigma公司),5-氯-1-甲基-4-硝基咪唑(硝化物Ⅲ)精制品(××制药厂提供),硫唑嘌呤原料药若干批(由××药厂提供),甲醇(色谱纯),其它试剂均为分析纯。

1.2 溶液制备

硫唑嘌呤对照品溶液 精密称取硫唑嘌呤标准品25mg,置100ml量瓶中,加0.05mol/L氢氧化钠液2ml溶解,用流动相稀释至刻度。

硫唑嘌呤对照品稀溶液 精密量取上述溶液1ml,置100ml量瓶中,用流动相稀释至刻度。备用。

6-巯基嘌呤对照品溶液 精密称取标准品25mg,置100ml量瓶中,加0.05mol/L氢氧化钠液1ml溶解,用流动相稀释至刻度。精密量取1ml,置100ml量瓶中,用流动相稀释至刻度。

硝化物Ⅲ溶液 精密称取硝化物精制品25mg,置100ml量瓶中,加5ml甲醇溶解后,用流动相稀释至刻度,再精密量取1ml,用流动相稀释至100ml。

供试品溶液 取供试品适量(约25mg),精密称

定,照硫唑嘌呤对照品溶液配制。

1.3 分析方法

色谱条件 甲醇-水(20:80V/V)溶液1000ml,加入醋酸钠0.5g溶解,用0.1mol/L氢氧化钠液调节pH至8.5±0.5为流动相,流速1.2ml/min,检测波长为280nm。

分析法 精密量取硫唑嘌呤对照品稀溶液20μl,注入液相色谱仪,调节色谱仪灵敏度,使硫唑嘌呤峰高度达满量程的1/10,记录色谱图,测量峰面积,重复进样5次,RSD值不大于2.0%。再精密量取供试品溶液20μl注入液相色谱仪,测量除溶剂峰和主峰外的各有关物质峰面积,按外标法以硫唑嘌呤计,折算得单一杂质和总杂质质量。

2 结果与讨论

2.1 流动相的确立

本文应用碱性盐类离子抑制剂抑制硫唑嘌呤中硝化物等杂质的电离,使硫唑嘌呤与硝化物等杂质在ODS柱中有效分离,为此盐类的浓度及pH值正确选择至关重要。实验证明:当pH值升高盐类浓度增加时,明显使硝化物的保留时间缩短,但当pH值升至9时硫唑嘌呤峰拖尾严重,经实验确立醋酸钠浓度为0.05%(W/V)调节pH至8.5±0.5流动相体系,使得硫唑嘌呤及其杂质得以完全分离,理论板数按硫唑嘌呤峰计算应不低于2000,硝化物Ⅲ与硫唑嘌呤的分离度应不低于3.0,硫唑嘌呤与硝化物Ⅳ的最小检出限量分别为2ng、3ng。供试品色谱图见图1。

2.2 紫外吸收波长的选择

将供试品溶液色谱图与对照品溶液色谱图对照,6-巯基嘌呤,硝化物Ⅲ的相对保留时间分别为1.25、4、4.6。对色谱峰作紫外吸收扫描得图2,三者的紫外最大吸收波长分别为320nm、280nm、305nm。考虑杂质限量均按硫唑嘌呤计算,选择测定波长为280nm为宜。

2.3 样品测定结果

取4批符合中国药典规定的硫唑嘌呤按上述分

析法测定,结果表明部分样品的总杂质量大于1%,主要杂质为6-巯基嘌呤、硝化物Ⅲ,及未知杂质2。文献报导硫唑嘌呤不稳定,在常温下易发生降解反应,经我们HPLC分析确认6-巯基嘌呤为硫唑嘌呤的主要降解产物,未知峰2和硝化物Ⅲ的色谱保

留时间相近,推测可能为环合生成的5-氯-1-甲基咪唑的异构体在酸中硝化得到的硝化物Ⅲ的异构体,实验证明严格控制5-氯-1-甲基咪唑的纯度,有利于大幅度降低未知峰2的含量。

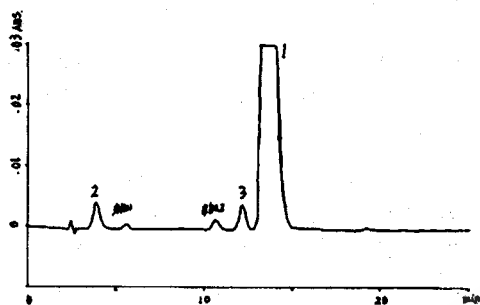


图1 硫唑嘌呤色谱图

1. 硫唑嘌呤 2. 6-巯基嘌呤 3. 硝化物Ⅲ

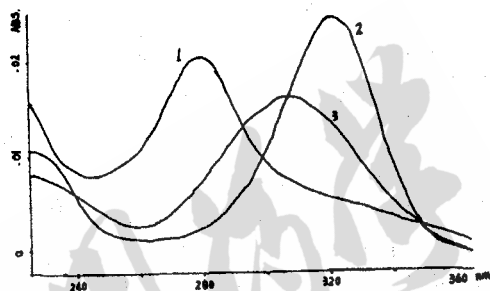


图2 紫外吸收图

1. 硫唑嘌呤 2. 6-巯基嘌呤 3. 硝化物Ⅲ

硫唑嘌呤中有关杂质含量 单位(%)

批 号	6-巯基嘌呤	未知杂质1	未知杂质2	硝化物Ⅲ	总杂质量
1	0.20	0.16	0.40	0.12	0.88
2	0.25	0.13	0.81	0.25	1.44
3	0.14	0.15	0.10	0.08	0.47
4	0.60	0.21	0.09	0.27	1.17

收稿日期:1996-10-22