

HPLC测定硫唑嘌呤中有关物质

庄建芬, 曾焕群 (浙江诚意药业有限公司, 浙江 洞头 325700)

摘要:目的 建立用 HPLC测定硫唑嘌呤中有关物质的测定方法。方法 采用 Phenomenex C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.05% 醋酸钠水溶液 (18:82), 流速: 1.2 mL · min⁻¹, 检测波长 240 nm。结果 在选定的色谱条件下, 硫唑嘌呤与起始物料、中间体等有关物质完全分离; 硫嘌呤在 0.45 ~ 1.125 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑(硝化物)在 0.3 ~ 0.75 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) 内呈良好的线性关系; 硫嘌呤和 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑平均回收率 ($n=9$) 分别为 100.1% 和 99.7%; 检测限分别为 3 ng · mL⁻¹ 和 2 ng · mL⁻¹。结论 本测定方法简便、准确、专属性好, 可用于硫唑嘌呤的有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 硫唑嘌呤; 硫嘌呤; 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑

中图分类号: R917.101; R927.12 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)05-0446-03

Determination of Related Substance in Azathioprine by HPLC

ZHUANG Jian-fen, ZENG Huan-qun (Zhejiang Chengyi Pharmaceutical Co. Ltd., Dongtou 325700, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of related substance in Azathioprine. **METHODS** Phenomenex C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase consisted of methanol-0.05% sodium acetate (18:82), at flow rate of 1.2 mL · min⁻¹, detection wavelength was set at 240 nm. **RESULTS** On the selection chromatographic condition, related substances of Azathioprine, starting material, intermediate and etc were separated completely. The linear ranges were 0.45 - 1.125 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) for Mercaptopurine and 0.3 - 0.75 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) for 5-chloro-1-methyl-4-Nitroimidazole. The average recoveries ($n=9$) of Mercaptopurine and 5-chloro-1-methyl-4-Nitroimidazole were 100.1% and 99.7% respectively. The limit of quantitations were 3 ng · mL⁻¹ and 2 ng · mL⁻¹. **CONCLUSION** The method proposed for the determination of the related substances of Azathioprine is simple, accurate and specific.

KEY WORDS: HPLC; azathioprine; 6-mercaptopurine; 5-chloro-1-methyl-4-nitroimidazole

硫唑嘌呤系硫嘌呤 (6-mercaptopurine) 的衍生物, 属免疫抑制药。通过体内分解为硫嘌呤抑制免疫活性细胞的 DNA 合成, 发挥嘌呤拮抗作用。临床主要用于异体移植时抑制免疫排斥, 多与皮质激素并用。也广泛用于治疗自身免疫性疾病 (如全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎等)。本品由 Elion 等于 1962 年首先合成。中国药典 2005 年版^[1] 采用 HPLC 检测波长为 300 nm 测定硫唑嘌呤中硫嘌呤限量; 美国

药典 USP30 版^[2] 采用 TLC 方法测定硫唑嘌呤中硫嘌呤限量, 欧洲药典 EP5.0^[3] 和英国药典 BP2007^[4] 均采用 TLC 方法测定硫唑嘌呤中硫嘌呤和 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑的限量。本文采用 HPLC 检测波长为 240 nm 测定硫唑嘌呤中硫嘌呤和 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑的限量及其他单一杂质限量, 使检测准确可行, 专属性强, 有利于更好地控制产品质量。

作者简介: 庄建芬, 女, 工程师 Tel: 13858820365 E-mail: zhuangjianfen123@163.com

1 仪器与试剂

Waters2695型高效液相色谱仪(包括2487紫外检测器、Empower色谱工作站和自动进样器);硫唑嘌呤对照品(批号:0197-9601,100%,中国药品检验所提供),巯嘌呤对照品(批号:100039-200602,100%,由中国药品检验所提供),1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑,次黄嘌呤及1-甲基-5-氯咪唑盐等对照品均经结构确认及纯度检验(由浙江诚意药业有限公司提供),硫唑嘌呤样品(批号:2006-0901,2006-0902,2007-0906,2007-0907由浙江诚意药业有限公司提供);甲醇为色谱级,醋酸钠为分析级,二甲基亚砜为色谱级,乙醇为色谱级,超纯水自制。

2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex C₁₈(4.6 mm×200 mm,5 μm),柱温为室温。流动相:甲醇-0.05%醋酸钠水溶液(18:82)。流速为1.2 mL·min⁻¹,检测波长为240 nm。理论板数按硫唑嘌呤峰计算,应不低于4000;硫唑嘌呤峰和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑(硝化物)峰的分离度应不低于2.0。

3 方法与结果

3.1 有关物质的检测

取本品适量(约25 mg),精密称定,用二甲基亚砜适量(约3 mL)溶解,用流动相稀释至100 mL,摇匀,该液为供试品;用流动相稀释至每1 mL中含1.25 μg的溶液为自身对照溶液;取1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑、巯嘌呤等有关物质对照品配制成1 mL中分别含0.50~0.75 μg的混合对照溶液。在上述色谱重要条件下,进样体积为20 μL,用外标法计算硫唑嘌呤(限量为0.3%),1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑(限量为0.2%)等有关物质质量,用自身对照法计算其他杂质质量(限量为0.5%)。

3.2 波长的选择

硫唑嘌呤制备的起始物料为次黄嘌呤和1-甲基-5-氯咪唑,工艺工序的中间体为巯嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑,考察硫唑嘌呤中可能存在的这些物质在200~400 nm中紫外吸收情况,得知在240 nm波长处硫唑嘌呤及各潜在的物质均有吸收,确定检测波长为240 nm。

3.3 准确度试验

取一批已知杂质质量的硫唑嘌呤样品,约25 mg,精密称定共9份,分别加入一定量的巯嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑对照品,使供试液含杂质质量为其限量的80%,100%,120%,依法测定,计算回收率。试验表明:本方法有关物质的回收率硫唑嘌呤为100.0%,1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑为99.7%。

3.4 重复性试验

精密称取6份样品,进行硫唑嘌呤样品中有关物质重复性测试,结果硫唑嘌呤杂质质量为0.02%,1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑的杂质质量为未检出,最大未知杂质为0.02%,总未知杂质为0.03%。

3.5 专属性试验

取空白溶液(取3 mL DMSO液,用流动相稀释至100

mL)考察其干扰情况,经试验表明空白溶液对色谱分析几乎无干扰。在本色谱条件下,能同时检测出次黄嘌呤、巯嘌呤、1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑、硫唑嘌呤和1-甲基-5-氯咪唑色谱峰,并达到完全分离(分离度≥2.0)。用高温、酸(碱)水解、氧化等方法对一批硫唑嘌呤供试液作破坏性试验,按上述色谱体系考察各降解产物色谱峰分离情况,试验表明色谱峰分离度≥1.5。

3.6 检测限与定量限

用流动相逐级稀释硫唑嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑对照溶液,按上述色谱体系,记录色谱峰高大于空白基线噪音3倍的溶液浓度为检测限,记录色谱峰高大于空白基线噪音10倍的溶液浓度为定量限。实验表明硫唑嘌呤 LOD, LOQ的溶液浓度分别为0.15 μg·mL⁻¹和0.3 μg·mL⁻¹,其信噪比的RSD分别为2.5%和6.6%;硝化物 LOD, LOQ的溶液浓度分别为0.1 μg·mL⁻¹和0.3 μg·mL⁻¹,其信噪比的RSD分别为2.0%和5.9%。

3.7 线性和范围

3.7.1 巯嘌呤线性试验 用流动相制成巯嘌呤浓度为0.45,0.6,0.75,0.9,1.125 μg·mL⁻¹标准系列溶液,进样测定。以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,得直线方程 $Y=31\ 708X-287$, $r=0.9999$ 。结果表明,巯嘌呤0.45~1.125 μg·mL⁻¹内线性关系良好。

3.7.2 1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑线性试验 用流动相制成硝化物浓度为0.3,0.4,0.5,0.6,0.75 μg·mL⁻¹标准系列溶液,进样测定。以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归,得直线方程 $Y=18\ 270X-842$, $r=0.9999$ 。结果表明,硝化物在0.45~1.125 μg·mL⁻¹内,浓度与峰面积呈良好线性关系。

3.8 耐用性试验

3.8.1 溶液稳定性试验 取硫唑嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑(硝化物)的混合对照溶液分别于0,4,8,12 h进样测定,考察其稳定性。硫唑嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑(硝化物)的峰面积RSD分别为0.26%,0.53%。试验表明,该混合对照溶液在24 h内有较好的稳定性。

取一批硫唑嘌呤样品,配制供试液,分别于0,4,8,12,24 h进样测定,考察其稳定性。硫唑嘌呤的峰面积RSD为0.86%。试验表明,供试液在24 h内有较好的稳定性。

3.8.2 不同甲醇比例试验 用硫唑嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑的混合对照溶液,考察其不同甲醇浓度(16%,18%,20%)流动相中色谱峰分离度。试验表明:在上述甲醇浓度范围内的流动相并不影响峰面积重复性及色谱峰的分离度。

3.8.3 不同浓度缓冲液试验 用硫唑嘌呤和1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑的混合对照溶液,考察其不同缓冲液浓度(0.048%,0.05%,0.052%)流动相中色谱峰分离度。试验数据表明:缓冲液不同浓度的流动相并不影响峰面积重复性及色谱峰的分离度。

3.9 样品测定

按照供试品溶液的制备方法和测定方法,对多批的硫唑嘌呤样品进行了测定,结果见表1。

表 1 有关物质样品测定结果 ($n = 2$)

Tab 1 Results of sample determination ($n = 2$)

批号	次黄嘌呤 /%	硫嘌呤 /%	1 - 甲基硝基氯咪唑 /%	1 - 甲基氯咪唑 /%	未知的单个杂质 /%	所有未知杂质 /%
2006-0901	0	0.02	0	0	0.02	0.03
2006-0902	0	0.03	0.04	0	0.05	0.06
2007-0906	0	0.02	0.04	0	0.06	0.06
2007-0907	0	0.02	0.03	0	0.04	0.05

4 讨 论

硫唑嘌呤中潜在杂质可能有次黄嘌呤、1-甲基-5-氯咪唑、1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑和硫嘌呤等物质(主要杂质为1-甲基-4-硝基-5-氯咪唑和硫嘌呤),选择检测波长为240 nm,可同时检测出上述物质的色谱峰。经光电二极管检测器考察表明硫唑嘌呤中未知杂质在240 nm波长处有紫外吸收。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005 年版 . 二部) [S]. 2005: 717.
- [2] USP(30) Vol II [S]. 2007: 1471.
- [3] EP(5. 0) Vol II [S]. 2005: 1037.
- [4] BP(2007) Vol I [S]. 2007: 198.

收稿日期 : 2008-04-29