

RP-HPLC 测定硫鸟嘌呤片的含量及有关物质

陈冬芬, 邓祖跃(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立反相高效液相色谱法测定硫鸟嘌呤片的含量及有关物质。方法 采用 Altima C₁₈ 色谱柱, 以 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(pH 3.0)为流动相, 柱温为 35 ℃; 检测波长 248 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 硫鸟嘌呤在 8~120 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 回收率为 99.27%。鸟嘌呤在 0.1~40 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 最低检测限为 0.12 mg·L⁻¹, 回收率为 100.23%。结论 本方法准确、灵敏, 精密度高、专属性强, 可用于硫鸟嘌呤片含量及有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 硫鸟嘌呤片; 含量测定; 有关物质

中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)10-0846-04

Determination of Tioguanine and Its Related Substances by RP-HPLC

CHEN Dongfen, DENG Zuyue(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the determination of the tioguanine tablet and its related substances. **METHODS** The analytical column was Altima C₁₈ and the mobile phase was 0.05 mol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate acid (pH 3.0). The column temperature was maintained at 35 ℃. The detection wavelength was set at 248 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** Tioguanine was linear in the range from 8 to 120 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 99.27%. Guanine was linear in the range of 0.1-40 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The limit of detection was 0.08 mg·L⁻¹. The average recoveries were 100.23%. **CONCLUSION** The method was proved to be accurate, sensitive and precise and showed highly specific. It can be applied for the content assay, as well as the related substances of tioguanine tablet.

KEY WORDS: HPLC; tioguanine tablet; content assay; related substance

硫鸟嘌呤为嘌呤类抑制剂, 是目前急性淋巴细胞白血病维持疗法的首选药物之一。中国药典采用紫外分光光度法和薄层色谱(TLC)法分别测定硫鸟嘌呤片的含量及有关物质^[1], 药品生产企业生产中发现该方法在药品的质量控制中有含量重复性差、有关物质分离度不足等缺陷。笔者参考了国内相关文献^[2-3]、英国药典^[4]及美国药典^[5]并结合中国药典的质量标准分析方法, 针对国内厂家的生产工艺, 建立了反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定硫鸟嘌呤含量, 并对硫鸟嘌呤片的有关物质进行了研究, 以确保其质量的安全有效。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪(包括自动进样器、紫外检测器和 Empower 工作站)(美国)。

硫鸟嘌呤片剂实验样品(批号: 070703, 070801, 080401, 浙江海力生制药有限公司, 规格 25 mg); 片剂空白辅料适量(浙江海力生制药有限公司); 6-硫鸟嘌呤对照品(批号: 115k8902, 美国 Sigma 公司, 纯度: 100%); 鸟嘌呤对照品(批号: 140631-200603, 中国药品生物制品检定所, 纯度: 100%); 甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂为国产分析纯。

2 方法与结果

作者简介: 陈冬芬, 女, 副主任技师 Tel: (0571)86461076

E-mail: pays666@yahoo.cn

2.1 溶液配制

2.1.1 供试品溶液 取硫鸟嘌呤片剂 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取细粉适量(相当于硫鸟嘌呤 40 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液超声溶解, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 再加流动相稀释制得质量浓度为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 对照品溶液 A 精密称取硫鸟嘌呤对照品适量, 加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液溶解, 加水稀释制得 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 精密量取储备液加流动相稀释制得浓度为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.1.3 对照品溶液 B 另外精密称取鸟嘌呤对照品适量, 加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 溶解并定量稀释制成 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液, 精密量取储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度制得浓度为 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱 Altima C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠溶液(磷酸调 pH 3.0); 柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 248 nm; 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。上述条件下, 理论板数按硫鸟嘌呤峰计大于 3 000, 硫鸟嘌呤与各有关杂质峰达基线分离。

2.3 专属性试验

2.3.1 分离度 本品生产原料之一为鸟嘌呤, 产生

的杂质主要是鸟嘌呤, 因此本实验中有关物质的控制主要是对鸟嘌呤的控制。取两对照品储备液等量混匀稀释至硫鸟嘌呤测定浓度, 进样; 同时另取“2.1.1”项下供试品溶液, 进样。按“2.2”项下色谱条件依法测定, 结果显示, 混合对照品溶液中的鸟嘌呤(10 min 出峰)与硫鸟嘌呤主峰(22 min 出峰)完全分离; 供试品溶液中的鸟嘌呤与硫鸟嘌呤主峰的分离与混合对照品溶液相同, 色谱图见图 1。

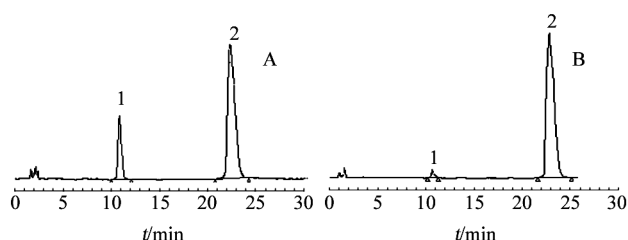


图 1 硫鸟嘌呤及鸟嘌呤 HPLC 图

A-对照品; B-硫鸟嘌呤片; 1-鸟嘌呤; 2-硫鸟嘌呤

Fig 1 Chromatograms of thioguanine and guanine

A-reference substance; B-thioguanine tablet; 1-guanine; 2-thioguanine

2.3.2 硫鸟嘌呤片空白辅料 按处方比例取片剂空白辅料适量(相当于硫鸟嘌呤 40 mg 的片剂辅料), 置 100 mL 量瓶中, 按“2.1.1”项下同法配制。在“2.2”色谱条件下进样, 记录色谱图。结果显示, 辅料峰不干扰主峰, 同时与杂质峰完全分离, 结果见图 2。

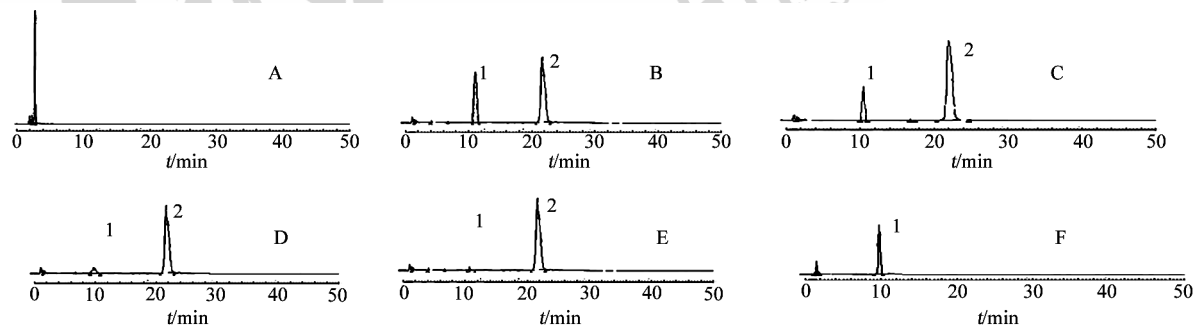


图 2 硫鸟嘌呤片的碱、酸、强光、热、氧化破坏色谱图

A-空白辅料; B-碱破坏; C-酸破坏; D-热破坏; E-光破坏; F-氧化破坏; 1-鸟嘌呤; 2-硫鸟嘌呤

Fig 2 HPLC chromatogram of thioguanine tablet and its degradation products

A-blank accessory; B-destroyed by alkali; C-destroyed by acid; D-destroyed by heat; E-destroyed by strong light; F-destroyed by H_2O_2 ; 1-guanine; 2-thioguanine

2.3.3 硫鸟嘌呤片的破坏实验 取批号 070801 硫鸟嘌呤片 20 片, 研细, 精密称取本品细粉适量(约相当于硫鸟嘌呤 40 mg), 置 100 mL 量瓶中, ①热破坏: 80 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 24 h, 放冷; ②光破坏: 4 500 lx 光照 5 d; ③酸破坏: 加入 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 室温放置 24 h, 用相应浓度氢氧化钠溶液中和; ④碱破坏: 加入 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 室温放置 24 h, 相应浓度盐酸溶液中和; ⑤氧化破坏:

加入 3% 过氧化氢溶液 5 mL, 摇匀, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 30 min, 放冷。以上各处理结束按“2.1.1”项下自“加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液超声溶解……”起同法配制, 过滤。按“2.2”色谱条件依法测定, 记录色谱图, 结果见图 2。

实验结果显示各色谱图相关峰均与主成分峰完全分离, 本品在双氧水、强酸、强碱作用下发生明显降解, 热破坏也会发生降解, 但强光照照射后

基本无变化,即本品在强酸、强碱和强氧化状态下性质不稳定。

2.4 线性范围

2.4.1 硫鸟嘌呤线性范围 将“2.1.2”项下的储备液用流动相稀释,分别得到 120, 80, 40, 16, 8 mg·L⁻¹ 硫鸟嘌呤对照品标准曲线系列溶液,进样,记录色谱图,按照峰面积(Y)与质量浓度(ρ, mg·L⁻¹)进行线性回归,得到回归方程 $Y=22\ 145\rho-33\ 043$, $r=0.999\ 9$, 可见硫鸟嘌呤在 8~120 mg·L⁻¹ 内线性关系良好。

2.4.2 鸟嘌呤线性范围 将“2.1.3”项下的储备液用流动相稀释,分别得到 40, 20, 10, 1, 0.5, 0.1 mg·L⁻¹ 鸟嘌呤对照品标准曲线系列溶液,进样,记录色谱图,按照峰面积(Y)与质量浓度(ρ, mg·L⁻¹)进行线性回归,得到回归方程 $Y=17\ 499\rho-2\ 826.7$, $r=0.999\ 9$, 可见鸟嘌呤在 0.1~40 mg·L⁻¹ 内线性关系良好。

2.5 检测限

将“2.1.3”逐步稀释鸟嘌呤对照品溶液,结果 LOD(S/N≥3)为 0.08 mg·L⁻¹。选择进样浓度为每 1 mL 中约含 40 μg 的供试品溶液,鸟嘌呤的 LOD 相当于供试品溶液中有关物质限值的 1/5,可满足有关物质限度测定要求。

2.6 重复性试验

取批号为 070703 供试品 6 份,分别按含量测定方法平行操作、测定,平均含量为 95.06%, RSD 为 1.4%,表明方法重复性良好。

2.7 日内、日间精密度的试验

取本品(批号:070703)称取 6 份,按供试品测定方法于同一日内分别制备溶液,进样测定得含量的日内精密度;另取 5 份供试品在不同的 5 日内分别制备溶液,进样测定得含量的日间精密度。结果:日内平均含量为 95.06%(RSD 为 1.6%);日间平均含量为 95.43%(RSD 为 2.3%)。

2.8 回收率试验

2.8.1 硫鸟嘌呤回收率试验 精密称取硫鸟嘌呤对照品约 32, 40, 48 mg 各 3 份,分别加入一定比例的辅料,分别置 100 mL 量瓶中,加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL,超声 15 min 溶解,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,使浓度分别为常规测定浓度的 80%、100%和 120%,摇匀。进样检测,根据实际称样量和测定量计算回收率。结果见表 1。

2.8.2 鸟嘌呤回收率试验 精密称取“2.1.1”项下的细粉适量(相当于硫鸟嘌呤 40 mg,批号:070801)9

表 1 硫鸟嘌呤回收率(n=9)

Tab 1 Recovery for thioguanine assay(n=9)

加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
31.32	31.18	99.54	99.27	0.20
31.67	31.48	99.40		
31.63	31.40	99.28		
40.21	39.90	99.24		
40.51	40.16	99.14		
39.71	39.32	99.01		
47.60	47.23	99.23		
47.92	47.60	99.33		
47.60	47.27	99.30		

份,分别置 100 mL 量瓶中,加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液超声溶解,再分别加“2.1.3”中的储备液 5, 10, 15 mL 各 3 份,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,再加流动相稀释制得硫鸟嘌呤质量浓度为 40 μg·mL⁻¹ 的溶液,摇匀,即得。进样检测,根据实际加样量、测定量及该批号的样品中鸟嘌呤预先测定量计算回收率。结果见表 2。

表 2 鸟嘌呤回收率(n=9)

Tab 2 Recovery for guanine assay (n=9)

加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.2	0.417	100.61	100.23	0.23
0.2	0.415	100.31		
0.2	0.414	100.64		
0.4	0.617	100.75		
0.4	0.612	99.98		
0.4	0.614	99.62		
0.6	0.813	100.04		
0.6	0.814	99.91		
0.6	0.817	100.23		

2.9 有关物质及含量测定结果

参照美国药典^[5]的有关物质检测方法并结合中国药典^[1]的相关测定项目建立本品有关物质的分析方法,分别取批号为 070703、070801、080401 的硫鸟嘌呤片按“2.1.1”项下方法制备硫鸟嘌呤片供试液,按“2.1.2”项下方法制备对照品溶液 A,按“2.1.3”项下方法制备对照品溶液 B,进样。按“2.2”项下色谱条件依法测定含量及有关物质,结果见表 3。

表 3 硫鸟嘌呤片含量与有关物质的实验结果(n=3)

Tab 3 Content and individual impurity of thioguanine tablet(n=3)

批号	含量/%	有关物质/%
070703	95.06	0.46
070801	94.81	0.54
080401	93.49	0.67

3 讨论

3.1 方法的选择

中国药典^[1]中,硫鸟嘌呤原料用 TLC 测定有关物质,用紫外分光光度法测定含量;英国药典^[4]也采用 TLC 测定有关物质,用电位滴定法测含量;美国药典^[5]采用 HPLC 测定有关物质和含量,但在

片剂中仍采用紫外分光光度法测定含量。硫鸟嘌呤生产企业反映紫外分光光度法测定含量结果重复性差,希望修订该方法。比较三国药典的含量测定方法,虽然 HPLC 和电位滴定法测定的结果重复性均较好,但考虑方法本身的精度,笔者选用了 HPLC。笔者在实际工作中发现,有关物质检测的 TLC,由于杂质斑点在主成分斑点下方,且位置比较接近,主成分斑点拖尾时常常掩盖了杂质斑点,使杂质经常与主成分斑点重叠,不利于结果的判断。参照美国药典^[5]硫鸟嘌呤原料药采用 HPLC 测定有关物质,笔者建立了 HPLC 测定硫鸟嘌呤片的有关物质,发现硫鸟嘌呤峰与其合成前体鸟嘌呤峰能很好分离。

3.2 色谱条件的建立

在方法建立的过程中,笔者参考了硫鸟嘌呤测定的相关文献^[2-3],将两种文献方法和本试验建立的方法进行对比,发现文献方法虽然对硫鸟嘌呤的灵敏度更高,但重复性不如本试验建立的方法,且对鸟嘌呤检出很低,综合评估,笔者参照美国药典^[5]

建立的方法比较适合该药品的质量控制。

目前,虽然美国药典^[5]收载了硫鸟嘌呤原料的有关物质及含量的 HPLC,在各国药品标准及医药企业标准中,硫鸟嘌呤片的含量及有关物质测定主要采用 TLC 及紫外分光光度法,而本实验建立了测定硫鸟嘌呤片的有关物质及含量的 HPLC,其灵敏度高,专属性强,重复性好,准确性强,能真实反映出本品的质量情况。

REFERENCES

- [1] Ch.P (2005) Vol II (中国药典 2005 年版. 二部) [S]. 2005: 716-717.
- [2] LI F, YE Q, TANG Y, et al. Determination of thioguanosine in human red blood cells by HPLC [J]. J China Pharm(中国药房), 2006, 17(6): 438-439.
- [3] WU J H, HUANG M, TANG L F, et al. A Simple and rapid HPLC method for determination of 6-thioguanine concentration in Human Leukemic cells [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2002, 22(3): 237-239.
- [4] B.P. 2008 (Vol II) [S]. 2008: 2151.
- [5] U.S.P. (31th) [S]. 2008: 3389-3390.

收稿日期: 2009-01-22