

RP-HPLC法测定硫普罗宁的有关物质

杨海霞, 屈爱存, 刘彩霞, 于盛茂

(山东省生物药物研究院, 济南 250101)

摘要 目的: 建立反相高效液相色谱法测定硫普罗宁的有关物质, 并与药品标准收载的薄层色谱法进行比较。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 磷酸溶液-甲醇 (82:18), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL。结果: 硫普罗宁峰与相邻杂质峰能够完全分离。硫普罗宁浓度在 0.42~16.82 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 最低检测限为 0.54 ng。结论: 反相高效液相色谱法与薄层色谱法比较, 前者优于后者。反相高效液相色谱法操作简单, 能准确、快速检测硫普罗宁的有关物质, 可用于硫普罗宁的质量控制。

关键词: 反相高效液相色谱法; 硫普罗宁; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1562-03

RP-HPLC determination of related substances of tiopronin

YANG Hai-xia, QU Ai-cun, LU Cai-xia, YU Sheng-mao

(Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan 250101, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of related substances of tiopronin and to compare the HPLC method with the TLC method in the drug specification. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid solution-methanol (82:18) at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** Tiopronin was thoroughly separated with its nearest impurity. The calibration curve was linear in the concentration range of 0.42-16.82 μg·mL⁻¹ ($r=0.9999$) for tiopronin. The detection limit of tiopronin was 0.54 ng. **Conclusion** The RP-HPLC method is superior to the TLC method. The RP-HPLC method is simple, accurate and rapid, and can be used for quality control of tiopronin.

Key words RP-HPLC; tiopronin; related substances

硫普罗宁 (tiopronin) 为一种含游离巯基的甘氨酸衍生物, 其化学名为 *N*-(2-巯基丙酰基)甘氨酸, 分子式为 C₅H₉NO₃S₂。硫普罗宁能降低细胞线粒体 ATP 酶活性, 改善细胞结构和功能, 参与细胞代谢, 维持肝细胞谷胱甘肽浓度, 抑制过氧化脂质体形成, 防止三酰甘油的堆积, 保护肝细胞膜, 是新型代谢改善解毒剂, 临床上用于治疗肝炎、脂肪肝、酒精肝和药物性肝损害等疾病^[1]。国家药品标准收载了硫普罗宁的质量标准^[2], 其有关物质的检查方法为薄层色谱法。目前, 国内尚未见高效液相色谱法测定硫普罗宁有关物质的报道。薄层色谱法操作烦琐, 灵敏度低, 为更好地控制药品质量, 本文改用反相高效液相色谱法测

定硫普罗宁的有关物质, 并与薄层色谱法进行了比较。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 包括四元泵、二极管阵列检测器 (DAD)、自动进样器。硫普罗宁 (批号: 080903, 080917, 080925)、硫普罗宁对照品 (纯度为 99.5%, 含量为 99.8%) 均为本单位自制。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 磷酸为优级纯, 其他试剂均为分析纯。

2 溶液的制备

2.1 供试品溶液 取硫普罗宁约 20 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用 18% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用 18% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 0.1% 磷酸溶液 - 甲醇 (82: 18); 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 210 nm; 进样体积: 20 μL。

4 方法与结果

4.1 硫普罗宁与杂质峰的分离及主峰纯度检查

取供试品溶液, 按“3”项下色谱条件测定, 典型色谱图见图 1。供试品溶液色谱图中硫普罗宁峰与相邻杂质峰的分度为 2.79, 能够完全分离。硫普罗宁峰理论板数为 3730, 对称因子为 0.92, 符合测试要求。用二极管阵列检测器对硫普罗宁峰进行纯度角检查, 结果纯度因子在阈值范围内, 符合规定, 表明该峰为单一峰。

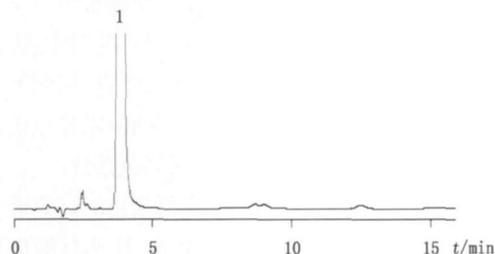


图 1 硫普罗宁样品色谱图
Fig 1 HPLC chromatogram of sample
1. 硫普罗宁 (tiopronin)

4.2 破坏性试验

4.2.1 强酸破坏 取供试品溶液 10 mL, 加 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 室温放置 3 h, 用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液中和后, 按“3”项下色谱条件测定, 色谱图见图 2-A。

4.2.2 强碱破坏 取供试品溶液 10 mL, 加 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 室温放置 5 h, 用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液中和后, 按“3”项下色谱条件测定, 色谱图见图 2-B。

4.2.3 氧化破坏 取供试品溶液 10 mL, 加 30% 过氧化氢溶液 0.2 mL, 室温放置 1 h, 按“3”项下色谱条件测定, 色谱图见图 2-C。

4.2.4 高温破坏 取供试品溶液 10 mL, 置 100 °C 水浴中加热 3 h, 按“3”项下色谱条件测定, 色谱图见图 2-D。

4.2.5 强光破坏 取供试品溶液 10 mL, 置 4500 k 光照强度下照射 15 h, 再置紫外灯下照射 10 min, 按“3”项下色谱条件测定, 色谱图见图 2-E。

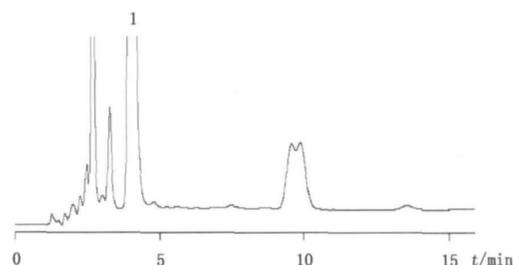
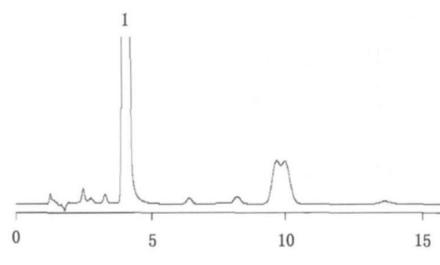
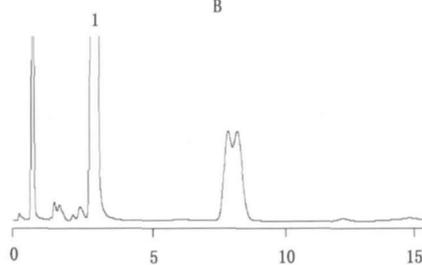
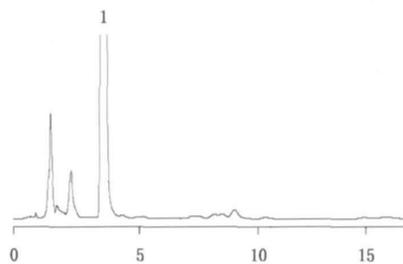
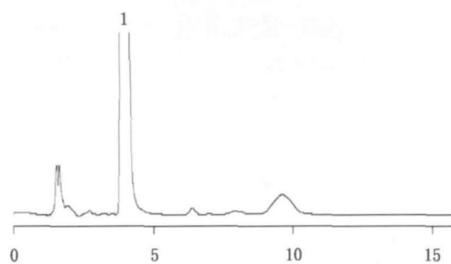


图 2 破坏性试验样品色谱图
Fig 2 HPLC chromatograms of destroyed samples
A. 酸破坏 (destroyed by HCl) B. 碱破坏 (destroyed by NaOH)
C. 氧化破坏 (destroyed by H₂O₂) D. 高温破坏 (destroyed by heat)
E. 强光破坏 (destroyed under strong light)
1. 硫普罗宁 (tiopronin)

结果表明,在强酸、强碱、氧化、高温、光照等剧烈条件下均有多个杂质峰产生,除强碱破坏外,其余条件破坏后硫普罗宁降解产物峰保留时间为主成分峰保留时间的 2.3 倍左右,为硫普罗宁的主要降解产物。各降解产物峰与硫普罗宁峰均能够完全分离。

4.3 线性关系考察 取硫普罗宁对照品 42.04 mg 置 50 mL 量瓶中,用 18% 甲醇溶解并定容至刻度,精密量取 2.5 mL,置 50 mL 量瓶中,用 18% 甲醇稀释至刻度,再分别精密量取 0.1, 0.5, 1, 2, 4 mL,置 5 个 10 mL 量瓶中,用 18% 甲醇稀释至刻度,摇匀。取上述溶液,按“3”项下色谱条件测定。以硫普罗宁溶液浓度 (X) 为横坐标,以对应峰面积 (Y) 为纵坐标,进行线性回归,回归方程为:

$$Y = 18.08X - 0.3094 \quad r = 0.9999$$

结果表明,硫普罗宁浓度在 $0.42 \sim 16.82 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

4.4 精密度试验 取 $4.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,按“3”项下色谱条件连续进样测定 6 次,硫普罗宁峰面积的 RSD 为 0.51%,结果表明,本法精密度良好。

4.5 稳定性试验 取供试品溶液,按“3”项下色谱条件,分别于 0, 1, 2, 4, 6 h 进样测定。结果表明,杂质峰面积之和随时间的增加而逐渐增加,说明该溶液不稳定,配制后应立即进样。

4.6 检测限试验 取对照溶液,用 18% 甲醇逐级稀释,按“3”项下色谱条件测定,以 3 倍信噪比计算硫普罗宁的最低检测限为 0.54 ng

4.7 有关物质测定 精密量取供试品溶液、对照溶液各 20 μL ,分别注入液相色谱仪,按“3”项下色谱条件测定,记录供试品溶液色谱图至硫普罗宁峰保留时间的 4 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰,

量取各杂质峰的峰面积和,并与对照溶液主成分的峰面积比较,用自身对照法计算有关物质的量,结果批号为 080903, 080917, 080925 的样品中有关物质质量分别为 0.53%, 0.94%, 0.70%。

5 讨论

5.1 检测波长的选择 用二极管阵列检测器提取硫普罗宁及其杂质的光谱图,结果显示,硫普罗宁及其杂质均为末端吸收,因此选择 210 nm 作为检测波长。杂质峰的紫外吸收与硫普罗宁基本一致,因此采用不加校正因子的主成分自身对照法计算硫普罗宁的有关物质质量。

5.2 流动相的选择 考察了 0.1% 磷酸溶液 - 甲醇、0.05 mol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 - 甲醇、庚烷磺酸钠磷酸盐缓冲溶液 - 甲醇等流动相体系,经条件优化,选择 0.1% 磷酸溶液 - 甲醇 (82:18) 作为硫普罗宁有关物质的检测条件,在该条件下测定的硫普罗宁峰理论板数及对称因子均符合检测要求。

5.3 与薄层色谱法的比较 在薄层色谱图中,硫普罗宁的杂质斑点少,且主斑点拖尾较严重,检测灵敏度较低,不利于杂质的检出,而采用高效液相色谱法能检测到多个杂质,该方法优于薄层色谱法。

5.4 小结 经方法学验证,本文所采用的高效液相色谱法操作简单,灵敏度高,能准确、快速检测硫普罗宁的有关物质,可用于硫普罗宁的质量控制。

参考文献

- 1 HE Jie-sheng(何解生). The progress in clinical application of tiopronin(硫普罗宁的临床应用进展). *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2008, 17(12): 1936
- 2 Drug Specifications Promulgated by SFDA (国家食品药品监督管理局药品标准). Vol 43(第 43 册). 2003: 140

(本文于 2008 年 12 月 1 日收到)