

HPLC 法梯度洗脱测定硫普罗宁注射液中的有关物质

卢京光, 王立云, 裴琳, 李欣荣, 赵鲁青, 楚敏

(青岛市药品检验所, 青岛 266071)

摘要 目的: 建立梯度洗脱的 HPLC 法测定硫普罗宁注射液中有有关物质。方法: 使用 C_{18} 色谱柱, 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 3.2) - 甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm。结果: 本法可快速有效分离硫普罗宁注射液中各有关物质。结论: 本方法灵敏、准确, 专属性强。

关键词: 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 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(2011)03 - 0499 - 05

HPLC determination by gradient elution of related substances in tiopronin injection

LU Jing - guang, WANG Li - yun, PEI Lin, LI Xin - rong,

ZHAO Lu - qing, CHU Min

(Qingdao Institute for Drug Control, Qingdao 266071, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of related substances in tiopronin injection by using gradient elution of HPLC. **Methods:** C_{18} column was adopted; Mobile phase consisted of buffer (pH 3.2) - methanol with gradient elution at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the detection wavelength was 210 nm. **Results:** Tiopronin and its related substance were obviously separated under the chromatographic system described above. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate and specific.

Key words: HPLC; gradient elution; tiopronin injection; related substances

硫普罗宁的结构中有非常活泼的巯基, 有氧化剂存在时, 2 个硫普罗宁分子中的巯基可形成二硫键, 生成一分子的二硫化硫普罗宁, 据文献报道^[1], 二硫化硫普罗宁是硫普罗宁原料药和制剂中存在的主要有关物质。现行国内外药典中均未收载该品种的原料和制剂, 全国评价性抽检抽取的 49 批硫普罗宁注射液共涉及 7 个国家食品药品监督管理局试行标准和 1 个征求意见稿^[2-9]。经探索性研究证明, 7 个标准中的有关物质检查法不能完全检出供试品中有关物质。本文采用梯度洗脱的 HPLC 法对硫普罗宁注射液的有关物质进行测定, 可全部控制其特殊杂质及其他杂质, 方法灵敏、准确, 结果可靠。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津公司 LC - 10A 高效液相色谱仪; 包括 LC - 10AT 泵、SIL - 10A 自动进样器、SPD -

10A 紫外检测器、ClassVP 色谱工作站。色谱柱 1: GRACE ALLTECH Alltima C_{18} AQ 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 色谱柱 2: Phenomenex Luna C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 色谱柱 3: SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 色谱柱 4: DIMA PLATISIA C_{18} 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$)。

1.2 试剂 硫普罗宁对照品 (批号 M070301), 由中国药品生物制品检定所提供; 磷酸二氢钾, 分析纯, 北京化工厂; 磷酸, 上海试剂一厂; 甲醇, 色谱纯, Merck 公司; 水, Millipore 超纯水; 硫普罗宁注射液样品 49 批 (7 个生产厂家)。

2 色谱条件与测定方法

2.1 色谱条件 色谱柱: GRACE ALLTECH Alltima C_{18} AQ 柱 ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 检测波长 210 nm; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相:

0.1 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 至 3.2) 为流动相 A、甲醇为流动相 B; 先以流动相 A - 流动相 B(95:5) 等度洗脱, 待硫普罗宁峰洗脱完毕后立即按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions

时间 (time) /min	流动相 (mobile phase) A - B
0	95:5
25	70:30
26	95:5
36	95:5

2.2 测定方法 精密量取本品适量, 加流动相 A 稀释制成 1 mg · mL⁻¹ 的溶液, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 加流动相 A 稀释成 1 mL 中含 0.01 mg 的溶液, 作为对照溶液; 取经 110 °C 加热 3 h 的供试品溶液适量, 加流动相 A 稀释制成 1 mg · mL⁻¹ 的溶液, 作为系统适用性溶液。精密量取对照溶液 30 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约为满量程的 20%; 精密量取系统适用性溶液 30 μL 注入液相色谱仪, 硫普罗宁与相邻杂质峰的分度应不低于 1.5, 再精密量取供试品溶液与对照溶液各 30 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。

3 方法学研究

3.1 破坏试验 取样品 3 份(每份约相当于硫普罗宁 50 mg), 分别置 50 mL 量瓶中, 其中 2 份分别加 1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液、1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液各 1 mL, 水浴加热 1 h, 冷至室温, 再分别加 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液、1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液调节 pH 至 7, 第 3 份加 3% 过氧化氢溶液 1 mL, 室温放置 1 h, 分别加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀。另取样品 2 支, 分别于 110 °C 加热 3 h 和 4500 lx 光照 6 d, 分别用流动相 A 稀释成 1 mg · mL⁻¹ 的溶液。按本法测定上述 5 种溶液, 结果表明, 在强酸、强碱、加热及光照条件下, 硫普罗宁均有不同程度的降解, 在氧化破坏条件下, 硫普罗宁出现明显降解。并且各破坏条件下的降解产物与主峰可达到有效分离, 结果见图 1。

3.2 辅料干扰试验 分别按 49 批供试品涉及到的 3 个不同处方比例配制空白样品溶液, 按上述方法进行, 记录色谱图, 结果表明辅料峰与主峰可达到有效分离。见图 1。

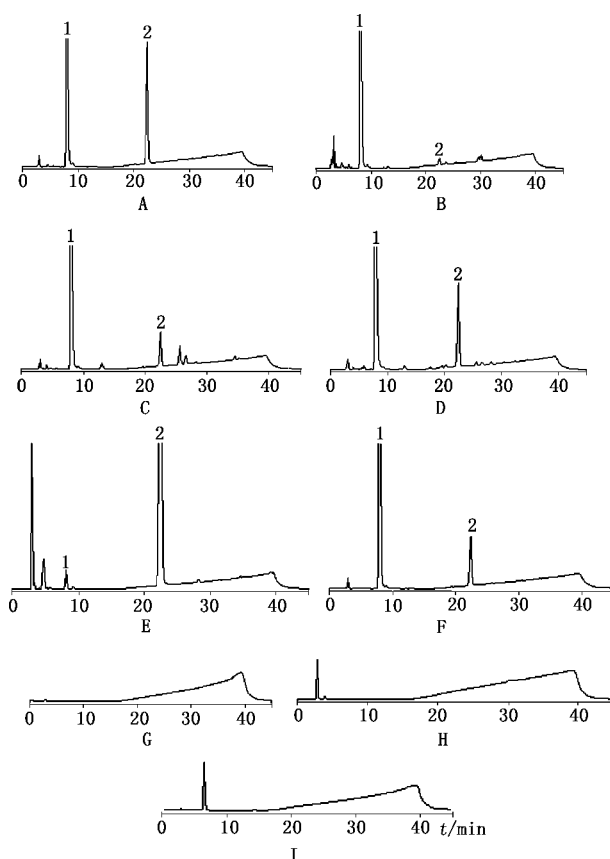


图 1 方法专属性考察图谱

Fig 1 The exclusion inspection of detective method

- A. 光照破坏 (destroyed by light) B. 碱破坏 (destroyed by alkali)
C. 酸破坏 (destroyed by acid) D. 热破坏 (destroyed by heat)
E. 氧化破坏 (destroyed by H₂O₂) F. 样品 (sample)
G. 辅料 1 (excipient 1) H. 辅料 2 (excipient 2)
I. 辅料 3 (excipient 3)
1. 硫普罗宁 (tiopronin) 2. 二硫化硫普罗宁 (tiopronin disulfide)

3.3 线性关系考察 精密称取硫普罗宁对照品 25 mg 置 250 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 分别精密量取对照品溶液 1.0 5.0 10.0 25.0 50.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下的色谱条件将上述 6 份对照品溶液分别进样 30 μL, 以峰面积(A) 为纵坐标, 浓度(C, μg · mL⁻¹) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程:

$$A = 2.4442 \times 10^4 C - 1.7934 \times 10^4 \quad r = 0.9997$$

表明硫普罗宁在 1 ~ 100 μg · mL⁻¹ 的范围内具有良好的线性关系。

3.4 进样精密度试验 取“3.3”项下 10 μg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 分别连续进样 6 次, 记录色谱图, 测得硫普罗宁峰面积的 RSD 为 0.6%, 结果表明此法精密度良好。

3.5 检测限 精密称取硫普罗宁对照品适量,用流动相 A 溶解并逐级稀释,按本法测定,当信噪比为 3 时,检出限为 0.4 ng。

3.6 重复性试验 精密量取同一批号的硫普罗宁注射液 6 份,加流动相 A 制成每 1 mL 中含硫普罗宁 1 mg 的溶液,按本法进行有关物质测定,6 份测定结果有关物质总峰面积平均值为 3204304, RSD 为 0.6%。

3.7 稳定性试验 取供试品溶液 1 份在室温下放置,在 0~11 h 内每隔 1 h 测定峰面积,硫普罗宁及其有关物质峰面积的 RSD 分别为 0.3% 和 0.6%,说明供试品溶液在室温下 11 h 稳定。

3.8 耐用性试验 选用 4 根不同品牌的色谱柱[色

谱柱 1: GRACE ALLTECH Alltima C₁₈ AQ 柱 (5 μm 250 mm × 4.6 mm); 色谱柱 2: Phenomenex Luna C₁₈ 柱 (5 μm 250 mm 4.6 mm); 色谱柱 3: SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ AQ 柱 (5 μm 250 mm × 4.6 mm); 色谱柱 4: DIMA PLATISIA C₁₈ 柱 (5 μm, 250 mm × 4.6 mm), 分别取“2.2”项下的系统适用性溶液按本法色谱条件进样,均能达到系统适用性要求。

4 供试品有关物质测定

取样品 49 批,分别按本法进行测定,测得杂质峰面积与对照溶液主峰面积相比较,计算杂质含量,并将结果与原标准进行比较,结果见表 2。

表 2 有关物质检测结果及方法比较

Tab 2 The related substances by proposed method compared with original method

样品编号 (sample No.)	二硫化硫普罗宁的含量 (content of tiopronin disulfide) /%		杂质总量 (total content of impurity) /%		方法及检出时间 (method and time for impurity detected)	
	原方法 (original method)	本方法 (this method)	原方法 (original method)	本方法 (this method)	原方法 (original method)	本方法 (this method)
1	1.5	1.8	1.7	2.1		
2	1.4	1.7	1.6	2.1		
3	1.6	1.9	1.8	2.0		
4	1.5	1.6	1.6	1.9		
5	1.3	1.6	1.4	2.0	等度 HPLC 法 ^[2] 检出全部有关物质所需时间超过 120 min (isocratic elution by HPLC, time for total related substances detected is more than 120 minutes)	
6	1.2	1.4	1.3	1.5		
7	1.4	1.7	1.6	2.0		
8	1.1	1.6	1.3	1.9		
9	1.6	2.1	1.9	2.4		
10	0.9	1.2	1.2	1.5		
11	1.3	1.6	1.6	2.0		
12	1.1	1.5	1.4	1.8		
13	1.1	1.6	1.4	1.8		
14	1.6	1.9	1.8	2.3		
15	1.4	1.7	1.5	1.9		
16	未检出 (not detected)	4.1	0.2	4.5	等度 HPLC 法 ^[3] 检出全部有关物质所需时间超过 180 min (isocratic elution of HPLC, time for total related substances detected is more than 180 minutes)	
17	未检出 (not detected)	10.5	0.4	10.9		
18	未检出 (not detected)	6.1	0.3	6.4		
19	未检出 (not detected)	6.0	0.2	6.2		
20	未检出 (not detected)	5.1	0.2	5.5		
21	未检出 (not detected)	4.5	0.2	4.8		
22	未检出 (not detected)	4.0	0.1	4.4		
23	未检出 (not detected)	2.0	<1.0	2.2		
24	未检出 (not detected)	2.1	<1.0	2.5		
25	未检出 (not detected)	2.8	<1.0	3.0		
26	未检出 (not detected)	4.1	<1.0	4.2	TLC 法 ^[6] (thin layer chromatography)	

续表 1

样品编号 (sample No.)	二硫化硫普罗宁的含量 (content of tiopronin disulfide) / %		杂质总量 (total content of impurity) / %		方法及检出时间 (method and time forimpurity detected)	
	原方法 (original method)	本方法 (this method)	原方法 (original method)	本方法 (this method)	原方法 (original method)	本方法 (this method)
27	未检出(not detected)	3.0	<1.0	3.3	TLC 法 ^[6] (thin - layer chromatography)	
28	未检出(not detected)	2.2	<1.0	2.4		
29	未检出(not detected)	3.1	<1.0	3.3	TLC 法 ^[8] (thin - layer chromatography)	
30	未检出(not detected)	3.8	<1.0	4.0		
31	未检出(not detected)	2.6	<1.0	2.9		
32	未检出(not detected)	2.7	<1.0	3.0		
33	未检出(not detected)	3.3	<1.0	3.6		
34	未检出(not detected)	4.1	<1.0	4.3		
35	未检出(not detected)	3.0	<1.0	3.2	TLC 法 ^[5] (thin - layer chromatography)	梯度洗脱 HPLC 法 ,检出全部有关物质需要 36 min。(gradient elution of HPLC ,time for total related substances detected is 36 minutes)
36	未检出(not detected)	1.3	<1.0	1.6	TLC 法 ^[7] (thin - layer chromatography)	
37	未检出(not detected)	1.1	<1.0	1.4		
38	未检出(not detected)	1.2	<1.0	1.4		
39	未检出(not detected)	1.3	<1.0	1.6		
40	未检出(not detected)	1.9	<1.0	2.1		
41	未检出(not detected)	1.8	<1.0	2.1		
42	未检出(not detected)	1.6	<1.0	1.8		
43	未检出(not detected)	11.1	<1.0	11.3	TLC 法 ^[4] (thin - layer chromatography)	
44	未检出(not detected)	8.0	<1.0	8.1		
45	未检出(not detected)	5.1	<1.0	5.2		
46	未检出(not detected)	6.3	<1.0	6.6		
47	未检出(not detected)	8.1	<1.0	8.3		
48	未检出(not detected)	13.6	<1.0	13.8		
49	未检出(not detected)	12.0	<1.0	12.3		

5 讨论

5.1 流动相的选择 比较了 4 种不同流动相系统,分别是 $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液等度洗脱^[2], 0.5% 磷酸溶液(用饱和氢氧化钠溶液调 pH 至 3.5)等度洗脱^[3], $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 至 3.2) - 乙腈 (95:5) 等度洗脱^[9], $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 至 3.2) - 乙腈 (95:5) 等度洗脱^[10],结果表明,当流动相为 100% 缓冲液时,有关物质全部检出所需时间超过 120 min; 当流动相含 5% 乙腈等度洗脱时,检测时间显著缩短,但对部分企业产品来说检出全部有关物质仍需要延长至主成分保留时间的 16 倍,约 90 min; 因此采用梯度洗脱是最关键选择。由于乙腈与缓冲液在梯度洗脱过程中混合产生大量气泡,造成基线不稳定,降低检出灵敏度,因此本方法选择 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 至

3.2) 和甲醇做流动相。

5.2 梯度的选择 酸破坏的硫普罗宁样品溶液产生较多的降解产物,因此将其做为梯度选择试验溶液,同时选择 6 个不同梯度洗脱程序进行试验。试验结果证明,当流动相中甲醇比例超过 40% 时,基线变化范围过大,会影响有关物质的检测灵敏度,当甲醇比例经 25 min 升至 30% 时,基线的稳定性、降解产物的分离效果较好; 维持 30% 甲醇 5 min、10 min 均再无降解产物峰出现,说明在 25 min 内各降解产物全部检出。

5.3 色谱柱对主要降解产物峰形的影响 在研究过程中我们制备了硫普罗宁主要降解产物的纯品溶液,并利用液质联用方法进行定性,发现其为二硫化硫普罗宁,且有异构体存在。经某些色谱柱洗脱后出现双峰,这与文献[10]的结果是一致的。因此实际测定中我们选择使用 GRACE ALLTECH Alltima C₁₈

AQ 色谱柱,既能对各降解产物实现良好的分离,满足系统适用性要求,又不分离异构体,提高了主要降解产物的检测灵敏度,便于计算。

5.4 49 批硫普罗宁注射液共涉及 7 个国家食品药品监督管理局试行标准。其中 5 个标准采用薄层色谱法检查有关物质,研究证明,薄层色谱法无法检出主要有关物质二硫化硫普罗宁,另外 2 个标准采用等度洗脱高效液相色谱法检查,规定检测时间为主成分保留时间的 3.5 倍,但我们在检测过程中发现检出全部有关物质需要时间为主成分保留时间的 16 倍以上,因此上述 2 个标准的有关物质测定值低于真实值。本方法采取梯度洗脱高效液相色谱法,实现了硫普罗宁主峰与各杂质峰间快速良好的分离,大大缩短了分析时间,能够检出全部有关物质,检出总量更高,实验结果更加快速可靠。

参考文献

- 1 Merck Index, 14th Ed. 2006. 1625
- 2 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH11292004
- 3 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH20312005
- 4 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH08602005
- 5 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH18342004
- 6 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH18072005
- 7 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH05902005
- 8 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration P R China(国家食品药品监督管理局标准). YBH04832005
- 9 Drug Specifications Promulgated by Chinese Pharmacopoeia Commission(a draft for discussing) (国家药典委员会硫普罗宁注射液质量标准征求意见稿)
- 10 HUANG Jing(黄静), YIN Yan-jie(尹燕杰), HUANG Hai-wei(黄海伟) *et al.* Determination of tiopronin injection and its related substances in tiopronin injection by HPLC (HPLC 测定硫普罗宁注射液含量及其有关物质). *Chin Pharm J* (中国药学杂志) 2009, 44(14): 1108

(本文于 2010 年 11 月 11 日收到)

《药物分析杂志》继续被评为 2011 年度中国科协精品科技期刊示范项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目管理办法(试行)》的有关规定,《药物分析杂志》参与了 2010 年度精品科技期刊示范项目和英文版期刊国际推广项目总结验收及 2011 年度精品科技期刊新增示范项目评审工作。根据中国科协的评审结果,《药物分析杂志》继续成为 2011 年度精品科技期刊示范项目 C 类项目。评选分 A、B、C 三类,各类项目资助额度分别为每项 25、15、5 万元/年。中国科协从 2006 年开始评选精品期刊项目至今,《药物分析杂志》已连续 6 年被评为中国科协精品科技期刊示范项目(C 类)。