

文章编号: 1004-1656(2008)03-0360-03

HPLC 测定四水合硫胺焦磷酸酯原料药含量

李程, 黎利军, 谢永美, 付超, 宋航*

(四川大学化工学院制药与生物工程系, 四川 成都 610065)

关键词: 高效液相色谱法; 含量测定; 四水合硫胺焦磷酸酯

中图分类号: O634 文献标识码: A

1999年, FDA 批准了注射用的 12 种复合维生素 (CERNEV II-12), 该制剂不同于以往的单纯性水溶性维生素与单纯性的脂溶性维生素组合, 它是一种同时具备水溶性与脂溶性维生素的复合维生素产品, 能够为患者提供全面的维生素支持。四水合硫胺焦磷酸酯 (Cocboxylase tetrahydrate) 属于维生素类药, 又名辅羧酶四水合物、四水合辅羧酶或四水脱羧辅酶, 是注射用 12 种复合维生素的成分之一。它是硫胺素焦磷酸酯 (TPP) 在体外的稳定化学形式, 而硫胺素焦磷酸酯在体内是由维生素 B₁ 转化而来, 即维生素 B₁ 就是通过体内转化为 TPP 发挥其生理、生化作用, 以辅酶形式参与糖代谢, 为机体提供能量^[1, 2]。澳大利亚治疗药物监督局已 2002 年批准四水合硫胺焦磷酸酯用于药品生产。目前, 中华人民共和国药典 2005 年版及国家药品标准尚未收载该品种。其合成工艺已有文献报道^[3-6], 本文采用高效液相色谱法对四水合硫胺焦磷酸酯原料药含量进行了测定, 可为质量控制提供快速、有效的分析手段, 该方法准确可靠, 操作简便易行。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-M 20A 检测器; Class VP 色谱工作站), 乙腈为色谱纯, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为国产分析纯。样品 (上海湘赣夸克生物科技发展有限公司)。对照品 (北京海步国际医药科技发展有限公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱: PHENOMENEX Luna C₁₈ 柱 (150mm × 4.6mm i.d., 5μm); 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钠-乙腈 (50/1); 检测波长: 235nm; 柱温: 30℃; 流速: 1.0 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

取供试品溶液适量, 加流动相稀释后, 在 200nm~400nm 范围内进行波长扫描, 最大吸收波长为 235nm, 故选择测定波长为 235nm。考虑到本品易溶解于水, 本实验选用水和乙腈混合作为流动相, 并对其比例进行了考察。初期采用水-乙腈 (100/1) 比例的流动相, 在氧化破坏性实验中发现主峰与降解产物峰的分离效果不好, 分离度小于 1.5 主峰和降解产物峰有拖尾现象, 柱压也较高。所以在流动相中加入了磷酸二氢钠, 并适当降低了乙腈在流动相中所占比例, 结果表明采用 0.05 mol/L 的磷酸二氢钠缓冲盐时峰形较好, 专属性实验中主峰与降解产物峰也得到较好分离。即流动相选择为 0.05 mol/L 磷酸二氢钠水溶液-乙腈 (50/1)。

2.2 方法专属性实验^[7]

精密称取四水合硫胺焦磷酸酯 2.50mg 两份, 分别加入 0.10 mol/L 盐酸溶液和 0.10 mol/L 氢氧化钠溶液 5mL 摇匀后于 100℃ 水浴中加热 1h 冷却后用流动相定容成 10mL。另取四水合硫胺焦磷酸酯 2.50mg 两份, 各加 10mL 流动相, 摇匀后一

收稿日期: 2007-11-16 修回日期: 2007-12-27

联系人简介: 宋航 (1957-), 男, 教授, 主要从事手性色谱技术研究。Email: hangsong@vip.sina.com

份置于 100℃ 水浴中加热 1h, 冷却后定容成 10mL, 另一份用强光照射 1h 放冷至室温; 另取四水合硫酸焦磷酸酯 2.50mg 加入 3% 的双氧水溶液 10mL, 摇匀后于室温下放置 2h, 将以上各样品过滤, 取续滤液作为破坏性试验溶液。由图 1 可以看出, 四水合硫酸焦磷酸酯经酸、碱和强光破坏

后, 主峰与降解产物峰的分离度分别为 2.06、2.05 和 1.85, 经高温和氧化破坏后, 主峰与降解产物各峰的最小分离度分别为 2.00 和 2.35, 均能达到基线分离, 表明采用 HPLC 法测定四水合硫酸焦磷酸酯含量的方法专属性良好。

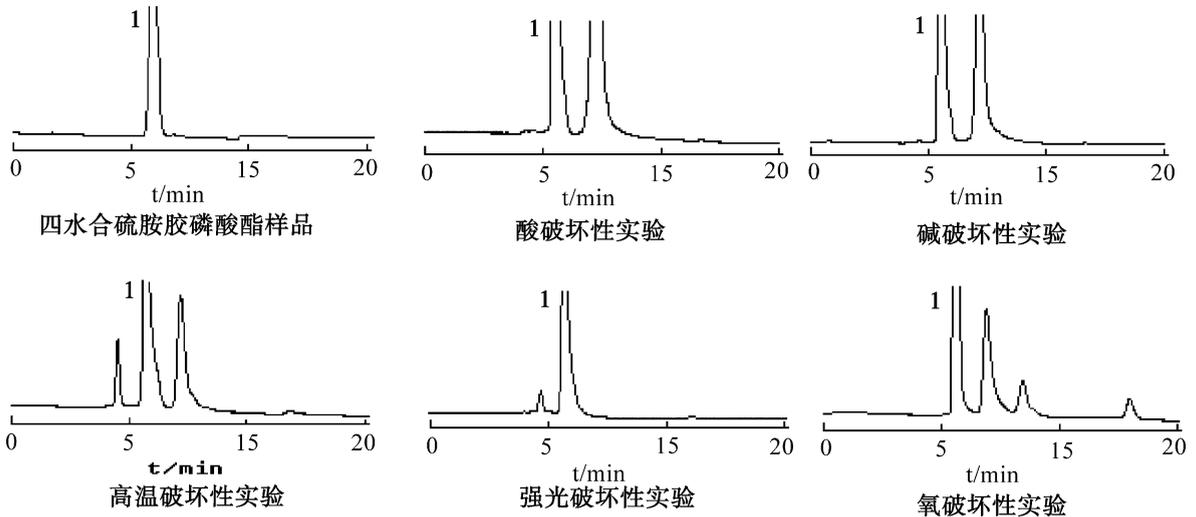


图 1 HPLC 方法专属性考察图谱 (1 四水合硫酸焦磷酸酯)

Fig. 1 HPLC chromatograms of Cocarboxylase tetrahydrate for specificity

2.3 线性关系和检出限

取四水合硫酸焦磷酸酯对照品 28.80mg 溶于 100mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1mL 于 2mL、5mL、10mL 和 25mL 量瓶中, 加水稀释至刻度。各取 10 μ L 注入液相色谱仪, 测定, 记录峰面积。对浓度与相应峰面积进行最小二乘法的回归分析, 得回归方程为 $A = -233.22 + 1.1426248 \times 10^7 C$ (A : 峰面积, mAv ; C : 浓度, mg/mL), 相关系数 r 为 0.9999, 结果在浓度 11.40 μ g/mL ~ 288.00 μ g/mL 范围内, 峰面积与测定浓度的线性关系良好。在上述的色谱条件下, 以信噪比 S/N 为 3 时^[7]测定的最低检测限为 0.16ng。

2.4 进样精密度

取对照品适量, 配制为 0.10mg/mL 的浓度, 连续取该溶液 5 次, 每次 10 μ L, 注入色谱仪, 分别记录其峰面积, 其峰面积的 $RSD\%$ 为 0.30, 表明精密度良好。

2.5 稳定性考察

精密称取样品 10mg 于 100mL 容量瓶中, 加水定容至刻度线, 摇匀, 作为供试品溶液, 分别在 0h、2h、6h、10h 和 12h 取样 10 μ L, 按上述色谱条件, 注入色谱仪进行测定。四水合硫酸焦磷酸酯的峰面

积的 $RSD\%$ 为 0.51, 表明供试品溶液在室温下放置 12h 内, 此溶液较为稳定。

2.6 重复性实验

称取样品 3 份, 用水配制为 0.10mg/mL、0.20mg/mL 和 0.50mg/mL 浓度的溶液, 精密量取 10 μ L 注入色谱仪, 各重复进样 5 次, 记录色谱图, 记录峰面积, 其峰面积值的 $RSD\%$ 分别为 0.31、0.27 和 0.33, 表明重复性良好。

2.7 样品测定

精密称取 3 份样品各 10mg, 用水定容于 100mL 容量瓶中, 摇匀, 每份样品平行测定 5 次, 分别记录峰面积。另取四水合硫酸焦磷酸酯对照品适量, 同法制备 0.10mg/mL 浓度的对照品溶液, 同法测定, 按外标法以峰面积计算每份样品的质量百分含量, 结果如表 1 所示。从表中可以看出, 3 份样品按干燥品计算百分含量在 98.86% ~ 99.05% 之间, 其 $RSD\%$ 为 0.10。

2.8 加标回收率实验

分别称取四水合硫酸焦磷酸酯样品和对照品各 10mg, 浓度均精密定容为 0.10mg/mL。各取 1mL 样品溶液, 分别加入 80%、100%、120% 对照品溶液, 精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪, 在选定的色谱条件下进行加标回收试验, 以外标法定量。

并计算回收率^[8], 其回收率范围为 98.56% ~ 100.50%, RSD% 为 0.99 结果列于表 2。

表 1 含量测定结果

Table 1 Determined results of Cocarboxylase tetrahydrate content

编号	1	2	3
样品含量 (%)	98.86	99.03	98.88
RSD (%)	0.16	0.13	0.22

表 2 加标回收率实验结果 (n=3)

Table 2 Recovery of Cocarboxylase tetrahydrate (n=3)

本底量 (μg)	加入量 (μg)	测得值 (μg)	回收率 (%)
100.0	80.0	177.4	98.56
100.0	100.0	200.1	100.50
100.0	120.0	215.6	99.20

3 结语

本实验方法操作简便、专属性好、灵敏度高, 不仅适用于四水合硫胺焦磷酸酯的质量控制, 亦可用于其制剂的含量与有关物质测定。

参考文献:

- [1] 简林凡. 维生素 B₁ 缺乏与防治 [J]. 井冈山医专学报, 2004, 11, (3): 68-71.
- [2] James P, Gary B, Michael W. Thiamine pyrophosphate $4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: a second polymorph of the neutral zwitterions [J]. *Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1979, B35 (7): 1633-1637.
- [3] Ben M, Irving G. Process for preparing Phosphorilate Thiamine [P]. US 2435750.
- [4] MERCK AG E. Process for the manufacture of the Tetrahydrate Salts of Cocarboxylase [P]. GB: 880573.
- [5] Knumm radt H, Beschman K, Wartenberg F H, et al. Method of purifying Thiamine Phosphates [P]. US 6596865.
- [6] 王维, 蒋勇, 张晓东. 一种高纯度四水合辅羧酶的制备方法 [P]. 中国专利: 1887891.
- [7] 刘思曼, 边清泉, 唐英, 等. RP-HPLC 在线衍生法测定红景天中痕量铅的研究 [J]. 化学研究与应用, 2006, 18(5): 588-590.
- [8] 唐英, 刘思曼, 胡德斌, 等. 反相高效液相色谱法测定川楝树皮中的川楝素 [J]. 化学研究与应用, 2005, 17(2): 276-278.

Determination of cocarboxylase tetrahydrate as a bulk drug by HPLC

LI Cheng, LI Li-Jun, XIE Yong-Mei, Fu Chao, SONG Hang*

(Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract A HPLC method for the determination of concentrations of Cocarboxylase Tetrahydrate was established. The HPLC conditions consisted of a PHENOMENEX Luna C₁₈ column (250mm × 4.6mm i.d., 5 μm) with column temperature at 30°C, 0.05mol/L NH_2PO_4 - acetonitrile (50:1, v/v) as a mobile phase with flow rate of 1.0mL/min and detection at 235 nm. The calibrated linear curve of Cocarboxylase Tetrahydrate was within 11.40 $\mu\text{g/mL}$ ~ 288.00 $\mu\text{g/mL}$ with the correlation coefficient of 0.9999. Cocarboxylase Tetrahydrate was completely separated from impurities. This accurate and reliable HPLC method is applicable for the quality control of Cocarboxylase tetrahydrate.

Key words HPLC; Cocarboxylase Tetrahydrate; determination

(责任编辑 李 方)