

HPLC法测定硫辛酸注射液中的有关物质

夏天水^{1*},熊全红²,罗云龙²(1.四川大学生物治疗国家重点实验室,成都 610041;2.成都倍特药业有限公司,成都 610041)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)21-2980-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.21.32

摘要 目的:建立测定硫辛酸注射液中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈,流动相A为0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH至3.0~3.1)、流动相B为甲醇-乙腈(1:1,V/V)(梯度洗脱),流速为1.2 ml/min,检测波长为215 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:在所建立的色谱条件下,硫辛酸与各杂质及其降解产物分离良好;硫辛酸检测质量浓度线性范围为0.828~52.992 μg/ml($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性试验的RSD<3%;杂质A的加样回收率为98.45%~105.73%,RSD=2.41%($n=9$);其最大未知单个杂质的质量分数为0.152%~0.189%,总杂质的质量分数为0.487%~0.516%。结论:该方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,可用于硫辛酸注射液中有关物质的测定。

关键词 硫辛酸注射液;高效液相色谱法;有关物质

Determination of Related Substances in Thioctic Acid Injection by HPLC

XIA Tianshui¹, XIONG Quanhong², LUO Yunlong²(1.State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;2.Chengdu Brilliant Pharmaceutical Co., Ltd, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Thioctic acid injection. METHODS: HPLC was performed on the column of Agilent Eclipse Plus C₁₈ with mobile phase A of 0.005 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted with phosphoric acid to pH 3.0 to 3.1) and B of methanol:acetonitrile (1:1, V/V) (gradient elution) at a flow rate of 1.2 ml/min; detection wavelength was 215 nm, column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: Under the established chromatographic conditions, thioctic acid with impurities and its degradation products were well separated; the linear range of thioctic acid was 0.828-52.992 μg/ml ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision and stability tests were lower than 3%; recovery of impurity A was 98.45%-105.73% (RSD=2.41%, $n=9$); the largest single impurity content in mass fraction was 0.152%-0.189%, the total impurity content in mass fraction was 0.487%-0.516%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and sensitivity, and can be used to determine the related substances of the Thioctic acid injection.

KEYWORDS Thioctic acid injection; HPLC; Related substances

硫辛酸,亦称 α -硫辛酸,为类维生素类物质,具有很强的抗氧化活性。德国是最早在临床上使用硫辛酸治疗糖尿病神经病变的国家,且已有40余年历史。目前我国,很多硫辛酸产品已在临床上用于治疗糖尿病及相关并发症,如硫辛酸注射液(规格:12 ml:300 mg)作为处方药在临床上用于治疗糖尿病周围神经病变引起的感觉异常症状^[1-4]。

《欧洲药典》7.0版(EP7.0)和《美国药典》34版(USP34)中的硫辛酸原料、进口药品注册标准中的硫辛酸注射液

(JX20040271)均记载了硫辛酸有关物质检测方法,但上述方法的分离度均不够理想。本试验探索建立了以高效液相色谱法(HPLC)测定硫辛酸注射液中有关物质的方法,旨在为提升硫辛酸注射液的质量控制水平提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,含G1315D型检测器、G1329B型自动进样器、G1311C型泵(美国安捷伦公司);AE200型电子天平(瑞

- 173.
- [4] 厦其乐,王涛,陆胜民,等.苦杏仁苷的分析、提取纯化及药理作用研究进展[J].食品科学,2013,34(21):403.
- [5] 汤庆发,谢颖,陈飞龙,等.苦杏仁中苦杏仁苷的存在形式及其影响因素[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):107.
- [6] Joo WS, Jeong JS, Kim H, et al. Prevention of Epimerization and Quantitative Determination of Amygdalin in Armeniacae Semen with Schizandrae Fructus Solution[J]. Arch Pharm Res,2006,29(12):1 096.
- [7] Kang SH, Jing H, Kim N, et al. Micellar electrokinetic

- chromatography for the analysis of D-amygdalin and its epimer in apricot kernel[J]. J Chromatog A,2000,866(2):253.
- [8] 陈佩,翟宇,王曼泽.HPLC法测定小儿清热止咳口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和苦杏仁苷的含量[J].中国药房,2011,22(44):4 212.
- [9] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定麻杏口服液中苦杏仁苷的含量[J].解放军药学报,2013,29(1):57.
- [10] 尚严,李进,刘伟,等.HPLC测定苦杏仁不同炮制方法中苦杏仁苷的含量[J].中医学报,2011,26(7):831.
- [11] 李翔,刘皈阳,马建丽,等.HPLC法测定克咳胶囊中苦杏仁苷的含量[J].中国药师,2013,32(7):1 010.

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:028-85142721。
E-mail:tianshui.xia@btyy.com

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-05-16)
(编辑:刘 柳)

士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

硫辛酸对照品(美国药典委员会提供,批号:F01018,纯度:99.9%);杂质A对照品(6,8-上硫辛酸,上海现代制药股份有限公司,批号:20100928005F,纯度:99.93%);硫辛酸注射液(成都倍特药业有限公司,批号:140201、140301、140302、140303,规格:12 ml:300 mg);乙腈、甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、磷酸为分析纯,水为自制高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈(100 mm×4.6 mm,3.5 μm);流动相:流动相A为0.005 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节pH至3.0~3.1)、流动相B为甲醇-乙腈(1:1,V/V),梯度洗脱(程序见表1);流速:1.2 ml/min;波长:215 nm;柱温:35℃;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	70	30
5	70	30
28	40	60
36	35	65
40	70	30
46	70	30

2.2 溶液的制备

2.2.1 杂质A对照品溶液 取杂质A对照品约10 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质A对照品贮备液。精密量取上述贮备液1 ml,置于25 ml量瓶中,用溶剂[0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈(1:1,V/V,用磷酸调节pH至2.5~2.6)]稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取硫辛酸注射液4 ml,置于25 ml量瓶中,加“2.2.1”项下溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 对照溶液 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液1 ml,置于200 ml量瓶中,加“2.2.1”项下溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 硫辛酸对照品溶液 取硫辛酸对照品约10 mg,精密称定,置于50 ml量瓶中,用“2.2.1”项下溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为硫辛酸对照品贮备液。精密量取上述贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加“2.2.1”项下溶剂稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 阴性对照溶液 取除硫辛酸原料药外的其他辅料,按该制剂处方及工艺制备阴性样品,然后按“2.2.2”项下制备方法操作,即得。

2.3 专属性试验

2.3.1 阴性干扰试验 取“2.2”项下供试品溶液、阴性对照溶液、杂质A对照品溶液、硫辛酸对照品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,主成分与各杂质分离良好,且辅料不干扰样品的有关物质测定。

2.3.2 强制降解试验 (1)碱破坏:精密量取样品(批号:140201)4 ml,置于25 ml量瓶中,加入5 mol/L氢氧化钠溶液2 ml,置于80℃水浴中放置15 min,取出放冷,加5 mol/L盐酸溶液2 ml回调,按“2.2.2”项下制备方法操作,即得碱破坏样品溶液。(2)氧化破坏:精密量取样品(批号:140201)4 ml,置于25 ml量瓶中,加入5%过氧化氢溶液0.1 ml,振荡5 min,按“2.2.2”项下制备方法操作,即得氧化破坏样品溶液。(3)高温破坏:精密量取经100℃高温破坏5 d的样品(批号:140201)4 ml,置于25 ml量瓶中,按“2.2.2”项下制备方法操作,即得高温破坏样品

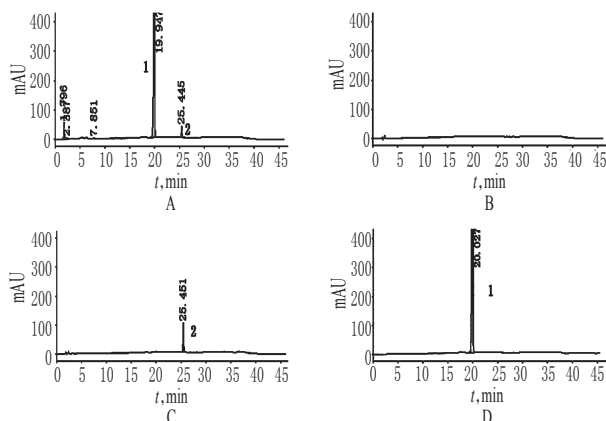


图1 阴性干扰试验高效液相色谱图

A.供试品;B.阴性对照;C.杂质A对照品;D.硫辛酸对照品;1.硫辛酸;2.杂质A

Fig 1 HPLC chromatograms of negative interference test

A.test sample; B.negative control; C.reference substance of impurity A; D.reference substance of thioctic acid; 1.thioctic acid; 2.impurity A

溶液。(4)光破坏:精密量取经16 000 lx光破坏7 d的样品(批号:140201)4 ml,置于25 ml量瓶中,按“2.2.2”项下制备方法操作,即得光破坏样品溶液。(5)酸破坏:精密量取样品(批号:140201)4 ml,平行取2份,均置于25 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液1 ml,置于80℃水浴中放置20 min,取出放冷。第1份加1 mol/L氢氧化钠溶液回调,结果发现溶液中有凝胶状物质不溶解;第2份加适量的乙二胺调节至凝胶状物质溶解,然后加磷酸调节pH至8.2左右,再加“2.2.1”项下溶剂稀释,但当溶剂加入一定量时样品变浑浊,定容后发现样品分层。因此,酸破坏样品的复溶存在一定问题。

取以上前4种破坏样品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。结果表明,硫辛酸注射液对碱和氧化极不稳定,杂质A在破坏过程中消失;在高温条件下,杂质虽有增加,但增加幅度不大;光照破坏试验中,杂质A增加幅度较大。虽经破坏后各样品降解产物增加,杂质增多,但杂质峰与主成分峰的分度度基本符合要求,且各主要降解产物之间基本分离,说明该方法能有效检出自制样品中可能产生的杂质和降解产物,该色谱条件能满足硫辛酸注射液的有关物质测定要求。在破坏前后,样品物料平衡率为95%~105%。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.4”项下硫辛酸对照品溶液0.25、0.5、1、2、4 ml,分别置于10 ml量瓶中,加“2.2.1”项下溶剂稀释至刻度,摇匀,即得线性工作溶液dz001~dz005;再分别精密量取“2.2.4”项下硫辛酸对照品贮备液0.8、1.6 ml,分别置于10 ml量瓶中,加“2.2.1”项下溶剂稀释至刻度,摇匀,即得线性工作溶液dz006、dz007。精密量取各线性工作溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以硫辛酸质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=2\ 831.5x-164.33$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,硫辛酸检测质量浓度线性范围为0.828~52.992 μg/ml。

2.5 检测限与定量限考察

精密量取“2.2.4”项下的硫辛酸对照品溶液适量,用“2.2.1”项下溶剂逐级稀释,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当主峰响应值为噪声水平的3倍时,测得检测限;当主峰响应值为噪声水平的10倍时,测得定量限。结

果,检测限、定量限分别为6.3、17.4 ng。

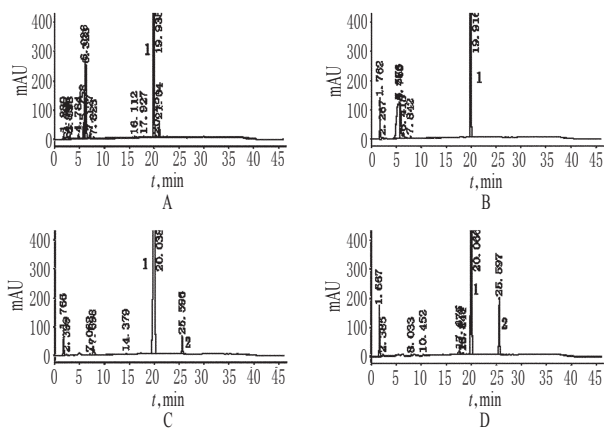


图2 强制降解试验高效液相色谱图

A.碱破坏样品;B.氧化破坏样品;C.高温破坏样品;D.光破坏样品;1.硫辛酸;2.杂质A

Fig 2 HPLC chromatograms of forced degradation test

A. sample destroyed by alkali; B. sample destroyed by oxidation; C. sample destroyed by high temperature; D. Sample destroyed by light; 1. thiocetic acid; 2. impurity A

2.6 精密度试验

取“2.2.4”项下的硫辛酸对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果,硫辛酸峰面积的RSD=0.42% (n=6),表明仪器精密度较好。

2.7 稳定性试验

取样品(批号:140201)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于室温条件下放置0、2、4、6、8 h时分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,硫辛酸峰面积的RSD=2.02% (n=5),表明供试品溶液在室温条件下放置8 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取样品(批号:140201)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算有关物质的量。结果,总杂质含量的RSD=4.86% (n=6),表明本方法的重复性较好。

2.9 加样回收率试验

精密量取已知杂质A含量的样品(批号:140201,硫辛酸含量:100.55%,杂质A含量:0.02%)4 ml,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的杂质A对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 杂质A加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test (n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
20.11	104.80	123.29	98.45		
20.11	104.80	123.98	99.11		
20.11	104.80	126.13	101.16		
20.11	209.61	227.94	99.15		
20.11	209.61	228.90	99.61	100.67	2.41
20.11	209.61	235.94	102.97		
20.11	314.41	329.77	98.49		
20.11	314.41	338.79	101.36		
20.11	314.41	352.53	105.73		

2.10 样品有关物质测定

取得测定的3批样品各适量,分别按“2.2”项下方法制备

供试品溶液和对照溶液,各取20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,保留时间为46 min,记录色谱,以自身对照法计算有关物质的量。供试品溶液杂质A峰面积不得超过对照溶液主峰峰面积的0.4倍(0.2%);最大未知单个杂质峰面积不得超过对照溶液主峰的峰面积(0.5%);总杂质峰面积不得超过对照溶液主峰峰面积的2倍(1.0%)。结果,3批样品中有关物质的量均符合规定,详见表3。

表3 样品有关物质测定结果(n=2)

Tab 3 Determination results of related substances in samples (n=2)

批号	杂质个数	最大未知杂质, %	杂质A, %	总杂质, %
140301	6	0.158	0.013	0.492
140302	6	0.189	0.015	0.516
140303	5	0.152	0	0.487

3 讨论

为了较好地控制硫辛酸注射液质量,笔者对比了EP7.0、USP34、JX20040271收载方法,EP7.0、USP34采用等度洗脱方法, JX20040271采用梯度洗脱方法。由于硫辛酸为强极性物质,在强制降解试验中产生了比硫辛酸极性更强的物质,如果采用等度洗脱的方法,这些物质很可能会无法检出。试验结果也表明,由于EP7.0、USP34采用了等度洗脱方法,氧化杂质峰与溶剂峰重合,不能达到有效检出的目的; JX20040271虽采用梯度洗脱,但各氧化杂质之间仍不能达到基线分离。

以往文献^[5-7]也报道过测定硫辛酸有关物质的方法,但都采用了等度洗脱方法,流动相中有机相的比例也均在50%左右,且在文献^[7]的强制降解试验中,只有碱破坏和氧化破坏能达到质量守恒,说明在其他条件破坏中降解产物未能被完全检出。

预试验中还发现采用JX20040271方法溶剂[0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈(40:60, V/V,用磷酸调节pH至3.5)]制备供试品溶液时,易出现浑浊。故参考USP34对溶剂的pH值进行调整,以供试品溶液澄清为目标。结果发现,溶剂pH值调整为2.5时,制备的供试品溶液澄清。因此,将制备供试品、对照品溶液的溶剂调整为0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈(1:1, V/V,用磷酸调节pH至2.5~2.6)。

综上所述,本试验所建立的方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,重复性、精密度等各项指标均良好,能满足硫辛酸注射液有关物质测定的要求。

参考文献

- [1] 刘宇.硫辛酸[J].精细与专用化学品,2005,13(10):18.
- [2] 李安林.α-硫辛酸的研究进展[J].食品科技,2008,33(4):240.
- [3] 汤春芳,刘云国,徐伟华,等.硫辛酸的研究概况[J].中国生化药物杂志,2005,26(1):52.
- [4] 张金彦,吉绍长.药物硫辛酸的研究进展[J].现代化工,2012,32(5):32.
- [5] 周自贵,金春,苏晋,等.HPLC测定硫辛酸注射液的含量与有关物质[J].中国药学杂志,2009,44(20):1582.
- [6] 费瑞娟,陈祥峰,倪静文.高效液相色谱法测定硫辛酸注射液中有有关物质及其含量[J].中国当代医药,2010,17(35):44.
- [7] 叶汝汉,张怡,彭磊,等.硫辛酸片含量与降解物的高效液相色谱测定研究[J].分析测试学报,2013,32(7):894.

(收稿日期:2015-10-08 修回日期:2016-06-12)

(编辑:周 箐)