·实验研究·

HPLC-CAD 法测定注射用生长抑素中甘露醇的含量

张　伟,张　慧,李　晶,孙　悦,李　懿,梁成罡
(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

[摘要]　**目的**:研究并建立 HPLC-CAD 法测定注射用生长抑素中甘露醇的含量。**方法**:采用 Agilent 300Extend-C_{18}色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(15∶85),流速 1.0 mL·min^{-1},柱温 35 ℃,进样量 20 μL;检测器为 CAD,雾化气体为氮气,蒸发管温度 50 ℃,增益值 1,气流压力为 60 psi。**结果**:甘露醇的检测限为 1.004 μg·mL^{-1},定量限为 3.012 μg·mL^{-1},二次拟合范围为 0.1~1.0 mg·mL^{-1}(R^2=0.999 8),平均回收率(n=9)为 99.1%(RSD=0.60%)。**结论**:该方法简单、快速、灵敏、准确,可对注射用生长抑素中甘露醇进行质量控制。

[关键词]　HPLC;CAD;注射用生长抑素;甘露醇
[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003-3734(2021)12-1126-06

Determination of mannitol in somatostatin for injection by HPLC-CAD

ZHANG Wei, ZHANG Hui, LI Jing, SUN Yue, LI Yi, LIANG Cheng-gang
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To establish an HPLC-CAD method for determination of mannitol in somatostatin for injection. **Methods**: Mannitol was determined by HPLC-CAD with Agilent 300Extend-C_{18} column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (15∶85) at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μL. Charged aerosol detector (CAD) was used as detector, the evaporate tube temperature was 50 ℃, nebulizer gas was nitrogen, the flow pressure was about 60 psi, and the gain value was 1. **Results**: The detection limit for mannitol was 1.004 μg·mL^{-1}, and the limit of quantitation was 3.012 μg·mL^{-1}. The quadratic curves showed good linearity in the range of 0.1~1.0 mg·mL^{-1}(r^2=0.999 8). The average recovery was 99.1% (RSD=0.60%). **Conclusion**: This method is simple, rapid, sensitive, accurate and suitable for the quality control of mannitol in somatostatin for injection.

[**Key words**]　HPLC; CAD; somatostatin for injection; mannitol

注射用生长抑素是采用多肽固相合成工艺人工合成的化学药物,与天然内源性生长抑素作用相同[1-2]。现阶段主要用于治疗严重急性食道静脉曲张出血、严重急性胃或十二指肠溃疡出血、并发性急性糜烂性胃炎、出血性胃炎,胰、胆或肠瘘的辅助治疗,胰腺手术后并发症的预防和治疗,糖尿病酮症酸中毒的辅助治疗等[3-5]。

甘露醇作为一种原料药在临床上被用作高渗脱水剂、利尿剂[6],来降低颅内压、眼内压以及治疗肾病等[7]。此外,甘露醇作为药用辅料经常用来作为注射用制剂中的骨架剂及片剂和胶囊剂中

[作者简介]　张伟,男,副主任药师,主要从事化药、生化药以及重组激素类药物质量控制研究。联系电话:(010)53851619,E-mail:maximer325@163.com。
[通讯作者]　梁成罡,男,研究员,主要从事激素及生物技术药物质量控制研究。联系电话:(010)53851638,E-mail:liangchenggang@nifdc.org.cn。张慧,女,主任药师,主要从事重组激素类药物质量控制研究。联系电话:(010)53851640,E-mail:zhanghui313@sina.com。

的稀释剂、黏合剂和稳定剂等[8]。在注射用生长抑素制剂中,甘露醇为骨架剂,作为载体用于形成硬质的均匀骨架,以改善玻璃瓶中冷冻干燥制剂的外观。

《中华人民共和国药典》2015 年版二部中该品种未对制剂中药用辅料甘露醇进行质控[9],此外,已上市的注射用胸腺五肽、注射用生长激素等以甘露醇作为骨架剂的制剂质量标准中均未对甘露醇进行质控。近年来,对于甘露醇临床不良反应时有报道,临床上出现静脉血管损害、急性肾功能损伤、过敏性休克甚至死亡等[10]。因此,对制剂中甘露醇的质量控制尤为重要。目前,对甘露醇原料药或药物制剂中赋形剂甘露醇的含量测定方法很多,例如 HPLC、离子色谱法(IC)等[11],且采用不同的检测器,比如常用的蒸发光散射检测器(ELSD)、示差折光检测器(RID)、脉冲安培检测器(PAD)等[12-14];分析过程中常用的色谱柱有糖专用柱、氨基柱、强阳离子钙型交换柱等[15-16]。然而,上述检测器及色谱柱均存在不足。ELSD 在检测过程中漂移管温度通常设定在 90 ℃ ~110 ℃,温度较高,存在安全隐患,且灵敏度在待测物浓度较低时表现一般,基线噪音很强;RID 受环境温度、湿度影响较大,且基线平衡时间较长;PAD 采用金电极,价格昂贵。糖专用柱和强阳离子钙型交换柱使用时柱温一般较高(70 ℃ ~80 ℃),保存条件苛刻(前者保存于约 50 mmol·L^{-1} 氢氧化钠溶液中,后者保存于约 0.05 mol·L^{-1} 硫酸溶液中并保存于 4 ℃冰箱中),耐用性差且价格昂贵;氨基柱常用来测定单糖、甘露醇、山梨醇等,其耐用性较差,洗脱过程中水的比例不宜过高(通常 <30%),使用过程中柱压会逐渐升高,填料易塌陷损毁,在测定某些药物制剂中赋形剂甘露醇时,药物主成分与填料常有较强吸附,很难被洗脱,从而残留于色谱柱中。

采用 HPLC 法,选用常规 C_{18}色谱柱,利用 CAD 检测器[17]对甘露醇进行分析定量的方法在国内外文献中均无相关报道。本文建立了 HPLC-CAD 法测定注射用生长抑素中甘露醇的含量,经方法学验证,该方法简单、稳定、快速、灵敏、准确,并利用该方法对国内企业生产的注射用生长抑素中的甘露醇含量进行定量分析。

材　料

1　对照品、样品及试剂

甘露醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100523-201805,纯度:99.1%);注射用生长抑素(来自国内 12 家生产企业,共 86 批);乙腈(Fisher 公司,色谱纯);实验所用溶液均用电阻率为 18.2 MΩ·cm 的去离子水配制。

2　仪器

Thermo Ultimate3000 高效液相色谱系统(美国 Thermo 公司);Corona Veo CAD 检测器(美国 Thermo 公司);RS VWD 紫外检测器(美国 Thermo 公司);CORONA 氮气发生器(美国 PEAK 公司);色谱数据采集和处理采用 Chromeleon7 色谱工作站(美国 Thermo 公司);METTLER AG245 电子天平(美国 METLER ROLEDO 公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);Agilent 300Extend-C_{18} 色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm,美国 Agilent 公司)。

方法与结果

1　对照品储备液的制备

取甘露醇对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释成每 1 mL 含 1 mg 的溶液。

2　供试品溶液制备

取注射用生长抑素(国内某企业,批号:20170116D2)1 支,精密加入流动相 2 mL,使内容物溶解。精密量取 1 mL 置于 5 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

3　色谱条件

采用 Agilent 300Extend-C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(15∶85),流速为 1.0 mL·min^{-1},柱温为 35 ℃;VWD 紫外检测器,串联 CAD 检测器,蒸发管温度为 50 ℃,增益值为 1,雾化气体为氮气,气流压力为 60 psi,进样量为 20 μL;二次拟合曲线定量。在上述色谱条件下,空白和样品色谱图见图 1。

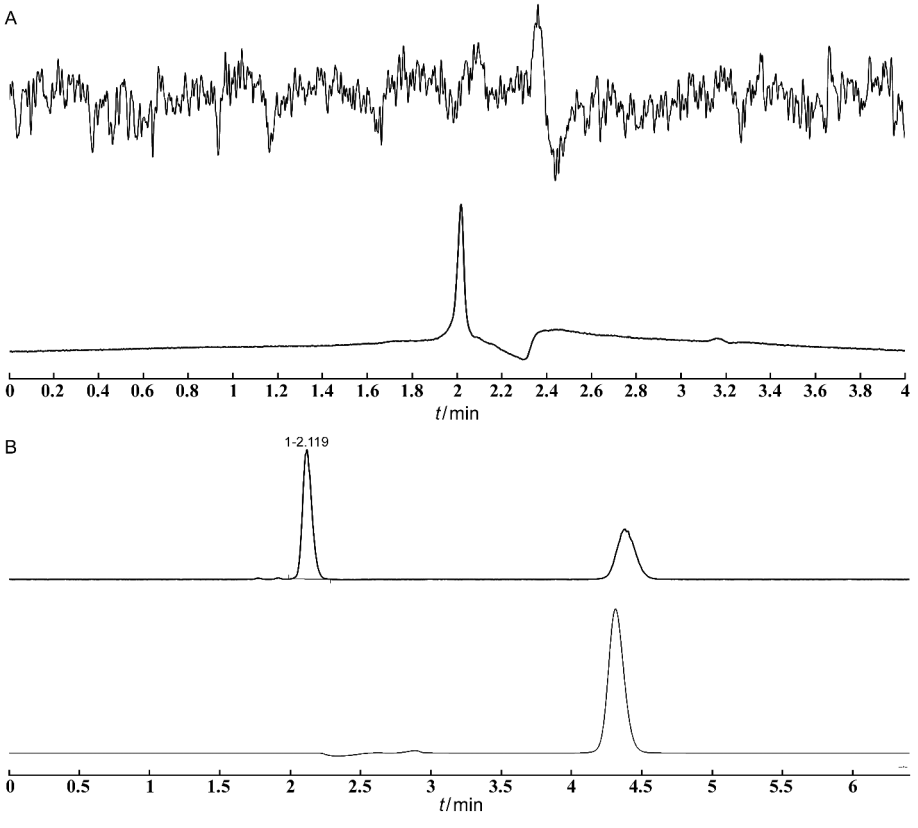


图 1 空白(A)与供试品(B)HPLC 色谱图

4 线性关系考察

取甘露醇对照品储备液,加流动相分别配制 0.1 ~ 1.0 mg·mL^{-1}和 0.01 ~ 0.1 mg·mL^{-1}标准系列溶液,进样 20 μL,以进样质量浓度 X(mg·mL^{-1})为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归。结果表明,0.1 ~ 1.0 mg·mL^{-1}浓度范围呈一元二次拟合曲线,0.01 ~ 0.1 mg·mL^{-1}浓度范围呈线性拟合,且二者均有较好的拟合度和较高的回归系数,见图 2。

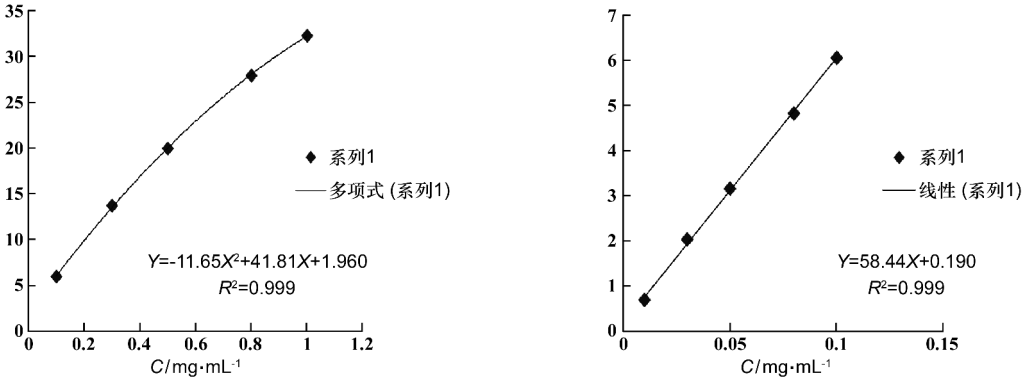


图 2 一元二次拟合曲线(A)和线性拟合曲线(B)

本文采用了线性浓度范围进行研究。分别精密量取对照品储备液适量,加流动相稀释制成每 1 mL 含甘露醇 0.1,0.3,0.5,0.8 和 1.0 mg 的标准系列溶液。进样 20 μL,以进样质量浓度 X(mg·mL^{-1})为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归。结果表明,在 0.1 ~ 1.0 mg·mL^{-1}范围内,二次拟合曲线良好,相关系数达到 0.999 8,二次拟合方程为 $Y = -11.625X^2 + 41.815X + 1.960\ 9$。按照信噪比 S/N 为 3 确定方法的检测限,结果为 1.004 μg·mL^{-1},以信噪比 $S/N = 10$ 作为定量限,结果为 3.012 μg·

mL^{-1};甘露醇色谱峰理论塔板数 >5 000。

5 精密度试验

按上述色谱条件,取供试品溶液连续进样 6 次,结果为甘露醇峰面积的 RSD 为 0.92%,<2%,符合要求。

6 稳定性试验

按上述色谱条件,取“**2**”项下的供试品溶液分别在 0,2,4,6,8,12 和 24 h 进样 1 次,结果为甘露醇峰面积的 RSD 为 1.01%,<2%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

7 重复性试验

取批号 20170116D2 样品 6 瓶,按“**2**”项下方法配制供试品溶液,按“**3**”项下方法测定,6 瓶供试品溶液测定平均结果甘露醇含量为 4.8 mg·瓶$^{-1}$,RSD 为 0.59%,<2%,说明本方法重复性较好。

8 加标回收率试验

精密量取“**2**”项下的供试品溶液 1 mL,分别适量加入甘露醇对照品溶液,配置成低、中、高 3 个浓度水平的加标供试品溶液,按“**3**”项下方法测定,每个浓度水平测定 3 份供试品,计算回收率,结果见表 1。结果平均回收率分别为 99.06%,RSD 为 0.61%,<2%。

表 1 注射用生长抑素回收率试验结果 $n=3$

样品	底值/mg·mL^{-1}	加入量/mg·mL^{-1}	测定量/mg·mL^{-1}	回收率/%	RSD/%
1	0.476 1	0.301 2	0.386 6	98.64	0.60
2	0.476 1	0.301 2	0.385 6	97.97	
3	0.476 1	0.301 2	0.388 2	99.70	
4	0.476 1	0.502 0	0.487 9	99.54	
5	0.476 1	0.502 0	0.485 4	98.55	
6	0.476 1	0.502 0	0.488 5	99.78	
7	0.476 1	0.803 2	0.636 0	99.09	
8	0.476 1	0.803 2	0.635 2	98.89	
9	0.476 1	0.803 2	0.636 7	99.27	
平均				99.05	

9 样品的测定

国内 12 家生产企业的注射用生长抑素共 26 批。根据企业处方工艺可知不同企业的制剂中甘露醇含量为 5 ~ 100 mg,根据处方量,分别取 26 批制剂,精密加流动相制成每 1 mL 中约含甘露醇 0.5 mg 的溶液,按“**3**”项下方法测定。26 批注射用生长抑素测定结果见表 2。

表 2 甘露醇含量测定结果

企业	批号/规格	含量/mg·瓶$^{-1}$	平均含量/mg·瓶$^{-1}$	相对处方量的含量/%
A	170101(Ⅱ)/0.75 mg	8.5	8.5	106.2% ~107.5%
	160903(Ⅱ)/0.75 mg	8.5		
	170501(II)/0.75 mg	8.6		
B	20170101/3 mg	31.1	31.1	103.7%
C	20170301/0.25 mg	31.7	31.2	102.7% ~105.7%
	20170201/3 mg	31.1		
	20161202/3 mg	30.8		
D	1107151112/0.75 mg	5.0	4.8	92.0% ~100.0%
	1123161204/2 mg	4.9		
	1206160405/3 mg	4.6		
E	032161203/3 mg	118.7	120.9	118.7% ~122.4%
	032161204/3 mg	122.4		
	032161202/3 mg	121.6		

续表 2

企业	批号/规格	含量/mg·瓶$^{-1}$	平均含量/mg·瓶$^{-1}$	相对处方量的含量/%
F	16080106/3 mg	30.8	30.2	98.3% ~102.7%
	17030106/3 mg	30.2		
	16120106/3 mg	29.7		
G	17011821/3 mg	4.8	4.9	96.0% ~107.5%
	16111421/3 mg	5.0		
	16110721/3 mg	4.8		
H	170205/3 mg	4.7	4.7	94.0%
I	20161201/3 mg	30.8	30.1	116.8% ~123.2%
	20170401/3 mg	29.2		
	20161201/3 mg	30.2		
J	17100022/3 mg	10.6	11.1	106.0% ~115.0%
	17100011/0.75 mg	11.1		
	17100031/0.75 mg	11.5		
K	20170116D2/3 mg	4.8	5.0	96.0% ~104.0%
	20170115D1/3 mg	4.8		
	20170114D2/3 mg	5.2		
L	160905/3 mg	23.7	22.6	95.5% ~118.5%
	170302/3 mg	19.1		
	170202/3 mg	22.9		

讨　论

本试验选用了 Agilent 300Extend-C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),Waters symmetry C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm)和 Halo ES-C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm)这 3 个公司常用的 C_{18}色谱柱分别对样品进行测定。试验结果显示色谱峰形、保留时间均令人满意,生长抑素峰与甘露醇峰能保持较好的分离度,且甘露醇峰不受杂峰干扰。因此,认为常规的 C_{18}色谱柱或性能相当的色谱柱可用于该方法。此外,流动相配制较为简单,乙腈:水比例为15:85,在该条件下 C_{18}色谱柱具有较好的耐用性。

本文选用了 CAD 检测器,其蒸发温度为 35 ℃和 50 ℃ 2 个选项,经验证,在 50 ℃下测定,甘露醇具有较好的灵敏度。该检测器设置较为简单,运行条件温和、稳定,受环境影响较小。检测过程中串联了紫外检测器,并设定检测波长为生长抑素特定吸收波长 215 nm。经 2 种检测器下色谱图对比可以看出,甘露醇在紫外条件下无响应,且注射用生长抑素制剂中其他辅料如乳酸、醋酸、醋酸钠等均对甘露醇的测定无干扰。

本试验考察了不同色谱柱温度(30 ℃,35 ℃,40 ℃)对试验结果的影响,结果显示 35 ℃的色谱柱温度即可达到满意效果。

依据制剂处方量,要将制剂中甘露醇浓度稀释至曲线范围内,若采用低浓度曲线范围则需要较大的稀释倍数,要多步稀释,可能会带来误差,因此,本试验采用高浓度曲线范围对样品进行测定。该方法也可测定相关制剂中较低浓度的甘露醇含量。

利用该方法对国内 12 家企业的 86 批制剂中的甘露醇含量进行定量分析,可知大多数企业生产的制剂中甘露醇含量在处方量的 90.0% ~110.0%,有 4 家企业的制剂中甘露醇含量超过 110.0%,2 家企业超过了 120.0%。这引起了我们的注意,对企业来说,制剂工艺较成熟,但药用辅料含量批间差异较大;此外,不同企业制剂间的辅料含量也有差别。因此,生产企业在辅料投料过程中应严格按照 SOP 要求进行,质量标准中也应进行必要的质控。

利用该方法,适当调整乙腈-水的比例,对注射用胸腺五肽、注射用亚叶酸钙和注射用生长激素进行测定,见图 3。

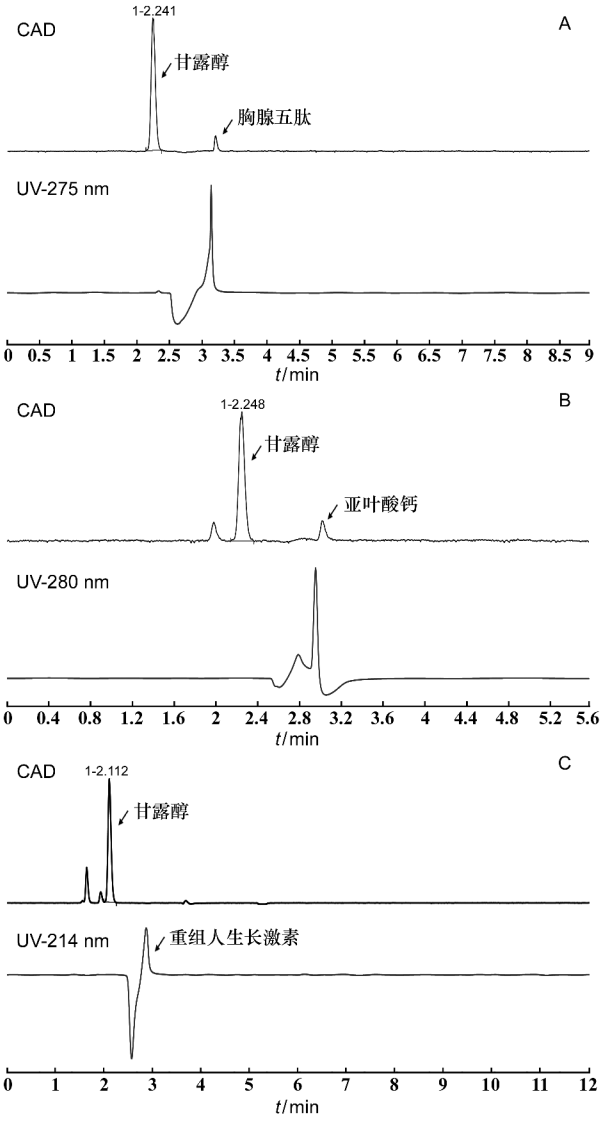


图 3 注射用胸腺五肽(A)、注射用亚叶酸钙(B)和注射用重组人生长激素(C)HPLC 谱图

从图 3 中可以看出,通过适当调整流动相比例,采用该方法可以快速、灵敏地测定某些注射用制剂中的赋形剂甘露醇,为相关制剂的质控提供了方法依据。

本文采用的方法可对注射用生长抑素中甘露醇进行准确定量,同时具有简便、快速、灵敏的优势。该方法的建立为其他注射用制剂的甘露醇控制提供了一定的参考,也为新版药典附录及各论方法的起草或修订提供一定依据。

[参 考 文 献]

[1] 周逸明. 固相多肽合成生长抑素的制备方法: 中国,1923851[P]. 2007 - 03 - 07.

[2] 崔学云, 杨平, 杨勇. 一种生长抑素的合成工艺: 中国, 104311639A[P]. 2015 - 01 - 28.

[3] 韩晓红, 田静, 邢学勇, 等. 不同剂量胰岛素配合生长抑素对糖尿病酮症酸中毒患者伴急性胰腺炎的疗效及安全性评价[J]. 抗感染药学, 2019,16(1): 160 - 162.

[4] 周玉梅. 生长抑素治疗肝硬化食管胃底曲张静脉出血的有效性和安全性[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018,5(24): 56.

[5] 希日莫, 赵立新. 生长抑素在治疗恶性肠梗阻及术后早期炎性肠梗阻中的应用效果分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019,6(38): 65.

[6] 钟健. 浅析甘露醇在临床中的应用[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017,5(17): 2 - 3.

[7] FENG YL, DONG J, DU PC, *et al*. Comparison of intraocular pressure reduction in eyes with different intraocular tamponades after pars Plana vitrectomy by 20% mannitol[J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2019, 55(4): 289 - 293.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015;通则 0101;3.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2015 年版. 二部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015;231

[10] 张雷. 甘露醇致过敏性休克文献分析[J]. 医药导报, 2019, 38(9): 1230 - 1233.

[11] 李国强, 李韵仪, 谭卓杰. 离子色谱法测定尿中甘露醇[J]. 广东化工, 2018,45(9): 232, 217.

[12] 刘薇, 肖新月, 宋宗华, 等. HPLC-RID 法替代滴定法测定百令胶囊中甘露醇含量的研究[J]. 药物分析杂志, 2014,34(1): 159 - 162.

[13] 李祥永, 徐连明. 基于 HPLC-ELSD 的注射用醒脑通中果糖、甘露醇、葡萄糖及蔗糖的快速分析[J]. 环球中医药, 2018, 11(8): 1212 - 1215.

[14] 周帅, 薛俊杰, 刘艳芳, 等. 高效阴离子色谱-脉冲安培检测法分析食用菌中海藻糖、甘露醇和阿糖醇[J]. 食用菌学报, 2011(1):49 - 52.

[15] 李爱欣, 周贤, 翁丽丽, 等. 星裂硬皮马勃不同部位甘露醇含量的高效液相色谱-示差折光检测[J]. 时珍国医国药, 2014,25(9): 2067 - 2068

[16] 晏菊姣, 汪鑫, 陈蓉, 等. 不同厂家注射用甲磺酸帕珠沙星中甘露醇的含量测定[J]. 医药导报, 2019,38(10): 1311 - 1313.

[17] 黄俊华, 钟妮, 巫志君. 高效液相色谱-电雾式(CAD)检测器的校准方法[J]. 计量与测试技术, 2019,46(7): 73 - 74.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 12 - 01