

# HPGPC法测定羧基麦芽糖铁重均分子质量和分子质量分布<sup>Δ</sup>

李蔷薇\*,李强#,郑筠,周亮(药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室/四川抗菌素工业研究所/成都大学,成都 610052)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3066-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.13

**摘要** 目的:建立测定羧基麦芽糖铁重均分子质量( $M_w$ )和分子质量分布( $D$ )的方法。方法:采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)检测3批羧基麦芽糖铁注射液(进口)和羧基麦芽糖铁原料(自制)的 $M_w$ 和 $D$ 。色谱柱为TSK G4000 PWXL,流动相为0.1%叠氮化钠溶液,流速为0.5 ml/min,检测器为示差折光检测器,柱温为35℃,进样量为20 μl。采用GPC软件计算结果。结果:精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.0%( $n=6$ );进口样品中 $M_w$ 为157 667, $D$ 为1.30;自制品的 $M_w$ 为162 000, $D$ 为1.42。结论:该方法精密性、稳定性、重复性、耐用性均较好,且操作简便,可用于羧基麦芽糖铁 $M_w$ 和 $D$ 的检测。

**关键词** 高效凝胶渗透色谱法;羧基麦芽糖铁;重均分子质量;分子质量分布

## Determination of Weight Average Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Ferric Carboxymaltose by HPGPC

LI Qiangwei, LI Qiang, ZHENG Yun, ZHOU Liang (Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Development of Sichuan Education Department/Sichuan Industrial Institute of Antibiotics/Chengdu University, Chengdu 610052, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of weight average molecular weight ( $M_w$ ) and molecular weight distribution ( $D$ ) of ferric carboxymaltose. METHODS: HPGPC method was adopted to detect the  $M_w$  and  $D$  of 3 batches of Ferric carboxymaltose injection (imported) and its raw material (self-made). The determination was performed on TSK G4000 PWXL column with 0.1% sodium azide solution with the flow rate of 0.5 ml/min. The detector was refractive index detector; the column temperature was set at 35℃, and sample size was 20 μl. The results were calculated with GPC software. RESULTS: RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.0% ( $n=6$ );  $M_w$  and  $D$  of 3 imported samples were 157 667 and 1.30; those of self-made samples were 162 000 and 1.42. CONCLUSIONS: The method has high precision, good stability, repeatability and durability. It can be used for the determination of  $M_w$  and  $D$  of ferric carboxymaltose.

**KEYWORDS** HPGPC method; Ferric carboxymaltose; Weight average molecular weight; Molecular weight distribution

羧基麦芽糖铁是一种治疗缺铁性贫血的新型补铁剂,是羧基麦芽糖与氢氧化铁的络合物,化学名为多核铁氢氧化物4(R)-[聚(1→4)-O-α-D-吡喃葡萄糖基]-氧基-2(R),3(S),5(R),6-四羟己酸复合物,分子式为 $[\text{FeOX}(\text{OH})\text{Y}(\text{H}_2\text{O})\text{Z}]_n\{\{[\text{C}_6\text{H}_{1005}]_m[\text{C}_6\text{H}_{1207}]\}_k\}$ ,其中 $n\approx 103$ , $m\approx 8$ , $l\approx 11$ , $k\approx 4$ ,分子质量约16万,CAS号9007-72-1,一般采用重均分子质量( $M_w$ )和分子质量分布( $D$ )来对本品的分子质量进行质量控制。本课题组参考2015年版《中国药典》(二部)<sup>[1]</sup>的右旋糖酐铁原料标准、2009年版《英国药典》<sup>[2]</sup>右旋糖酐铁注射液的分子质量和 $D$ 检测项,建立测定羧基麦芽糖铁 $M_w$ 和 $D$ 的高效凝胶渗透色谱(HPGPC)法(也称分子排阻色谱法),并对其进行方法学考察,以期为该品种的质量控制提供参考。

Δ 基金项目:药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室开放基金项目(No.10Y201504)

\* 助理研究员。研究方向:药物制剂、药物分析。电话:028-84216070。E-mail:liqiangwei@cdu.edu.cn

# 通信作者:助理研究员。研究方向:药物合成。电话:028-84216070。E-mail:liqiang@cdu.edu.cn

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-10AT型高效液相色谱仪,包括LC-10AT型输液泵、RID-10A示差折光检测器(日本岛津公司);GPC色谱工作站和GPC计算软件(北京龙智达科技发展有限公司);AE163型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 药品与试剂

右旋糖酐对照品(分子质量D0-即葡萄糖,中国食品药品检定研究院,批号:140637-201203);系列葡聚糖对照品( $M_w$ 分别为23 800、48 600、147 600、273 000,美国Sigma-Aldrich公司);羧基麦芽糖铁注射液(Vifor Pharma Deutschland GmbH公司,批号:20150523,规格:100 mg/2 ml);羧基麦芽糖铁原料(四川抗菌素工业研究所实验室自制品,批号:20150907,规格:100 mg/2 ml);叠氮化钠(上海恒远生物科技有限公司,分析纯);水为超纯水(四川抗菌素工业研究所实验室自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品A溶液 分别精密称取系列葡聚糖对照品,加流动相溶解并稀释制成10 mg/ml的溶液,用0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.1.2 对照品B溶液 精密称取右旋糖酐对照品(D0),加流动相溶解并稀释制成10 mg/ml的溶液,用0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.1.3 羧基麦芽糖铁注射液溶液 精密量取羧基麦芽糖铁注射液1 ml,置于50 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.1.4 羧基麦芽糖铁原料溶液 取羧基麦芽糖铁原料,加流动相溶解,稀释制成含铁(Fe)1 mg/ml的溶液,摇匀,即得。

## 2.2 色谱条件与系统适用性试验

以TSK G4000 PWXL(300 mm×7.8 mm, 10 μm)为色谱柱,以0.1%叠氮化钠溶液为流动相,柱温为35 ℃,流速为0.5 ml/min,采用示差折光检测器;理论板数按葡萄糖峰(即右旋糖酐D0对照品峰)计算,应不小于5 000,标样为已知分子质量的系列葡聚糖对照品。

## 2.3 标准曲线的制作

取对照品A溶液,按2015年版《中国药典》(二部)<sup>[1]</sup>附录V H分子排阻色谱法测定,取20 μl注入液相色谱仪中,记录色谱图及保留时间,结合已知的葡聚糖对照品的 $M_w$ ,以 $\lg M_i$ 对 $t_{Ri}$ 作图,结果见图1。回归方程为 $\lg M_i = 0.33t_{Ri} - 10.48$ ,相关系数 $r$ 为0.999 8。

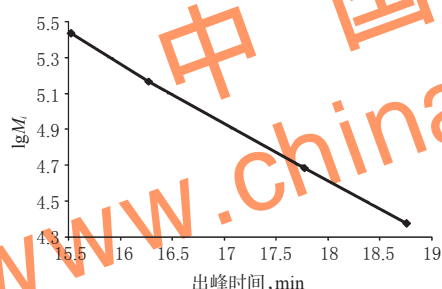


图1 标准曲线

Fig 1 Standard curves

## 2.4 专属性试验

取“2.1.4”项下的羧基麦芽糖铁原料溶液和空白溶剂(流动相),分别按“2.2”项下色谱条件进样20 μl检测,空白溶剂谱图在羧基麦芽糖铁色谱峰保留时间处无色谱峰出现,说明溶剂无干扰。

## 2.5 精密度试验

取对照品A溶液中的葡聚糖对照品 $M_w$ 值为147 600的对照品溶液,进样质量浓度为10 mg/ml,按“2.2”项下的方法连续测定6次,记录色谱图。 $M_w$ 值测定结果分别为147 000、148 000、147 200、146 500、146 800、147 000,平均值为147 083, RSD为0.34%( $n=6$ ),说明本测定方法精密度好。

## 2.6 稳定性考察

取羧基麦芽糖铁原料,加流动相制成质量浓度为10 mg/ml的溶液,按“2.2”项下的方法测定溶液在24 h内的稳定性,记

录色谱图。结果,0、2、4、8、12、16、20、24 h  $M_w$ 分别为162 000、160 000、160 000、161 000、162 000、161 000、160 000、160 000, RSD为0.55%( $n=8$ ),说明样品溶液在24 h内测定是稳定的。

## 2.7 重复性试验

取羧基麦芽糖铁原料6份,分别加流动相制成质量浓度为10 mg/ml的溶液,按“2.2”项下的方法测定,记录色谱图。 $M_w$ 值测定结果分别为161 000、162 000、161 000、160 000、160 000、161 000, RSD为0.47%( $n=6$ ),说明测定方法重复性好。

## 2.8 耐用性考察

取“2.1.2”项下系统适用性溶液,采用安捷伦1200高效液相色谱仪、安捷伦示差折光检测器、赛分科技SRT<sup>®</sup> SEC-100凝胶色谱柱(300 mm×7.8 mm, 10 μm),按“2.2”项下色谱条件进样20 μl测定,样品 $M_w$ 与 $D$ 的测定结果和TSK G4000 PWXL色谱柱相比无明显差别,证明该方法耐用性良好。

## 2.9 样品测定

按2015年版《中国药典》(二部)<sup>[1]</sup>附录V H分子排阻色谱法测定, $M_w$ 应在115 000~175 000之间, $D$ 应小于2.0。取本品适量,加流动相稀释成每1 ml约含10 mg的溶液,摇匀,滤过,作为供试品溶液。取20 μl注入液相色谱仪,记录色谱图。根据标准曲线,采用GPC专用软件计算出供试品的 $M_w$ 与 $D$ 。取羧基麦芽糖铁注射液3份及羧基麦芽糖铁原料3份,按“2.2”项下方法测定,结果见表1。

表1 羧基麦芽糖铁重均分子质量及分子质量分布检测结果

Tab 1  $M_w$  and  $D$  of ferric carboxymaltose

生产厂家	样品号	$M_w$	$D$	$M_w$ 平均值
Vifor Pharma Deutschland GmbH公司	1	158 000	1.30	157 667
	2	159 000	1.30	
	3	156 000	1.30	
四川抗菌素工业研究所实验室	1	161 000	1.42	162 000
	2	163 000	1.42	
	3	162 000	1.42	

表1结果显示,自制品的 $M_w$ 、 $D$ 与进口样品基本一致。

## 3 讨论

### 3.1 检测器的选择

示差折光检测器是一种通用型检测器,具有广泛的适用范围;同时该检测器对糖类检测灵敏度较高、稳定性好、操作方便。另查阅2015年版《中国药典》(二部)<sup>[1]</sup>,绝大多数天然高分子药物或者高分子聚合物药物的检测均使用示差折光检测器,故选择其作为本研究的检测器。

### 3.2 流动相比例的选择

凝胶色谱的分离原理是分子筛原理,根据分子的大小不同进行分离。羧基麦芽糖铁注射液pH值介于5.0~6.5之间,确定具有一定离子强度的0.1%叠氮化钠溶液为流动相,既可以减少样品在柱上的吸附,也可防止在色谱分离过程中样品分子之间相互缔合,以保持其溶液中正常的分子形态。

### 3.3 分子排阻色谱法

凝胶色谱技术又称分子排阻色谱法,是20世纪60年代初发展起来的一种快速、简单的分离分析技术,主要用于高聚物

的相对分子质量分级分析以及相对分子质量分布测试<sup>[9]</sup>。分子排阻色谱法是根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术。分子排阻色谱法的分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。色谱柱多以亲水硅胶、凝胶或经修饰凝胶如葡聚糖凝胶(Sephadex)和聚丙烯酰胺凝胶(Sephacryl)等为填充剂,这些填充剂表面分布着不同尺寸的孔径,药物分子进入色谱柱后,其中的不同组分按其分子大小进入相应的孔径内,大于所有孔径的分子不能进入填充剂颗粒内部,在色谱过程中不被保留,最早被流动相洗脱至柱外,表现为保留时间较短;小于所有孔径的分子能自由进入填充剂表面的所有孔径,在色谱柱中滞留时间较长,表现为保留时间较长;其余分子则按分子大小依次被洗脱。

### 3.4 羧基麦芽糖铁 $M_w$ 与 $D$ 的控制

羧基麦芽糖铁属于高分子聚合物的范畴,所以  $M_w$  与  $D$  是该品种质量控制的重要指标,在一定程度上可以反映出国产样品与进口上市品之间的质量差异。在静脉补铁剂第一代产品右旋糖酐铁注射液的临床使用过程中,过敏反应是主要的不良反应,主要为过敏性休克和过敏性皮炎,也有过敏反应引起死亡的报道<sup>[3]</sup>。章蕴毅等<sup>[5]</sup>报道,制剂1中右旋糖酐铁峰位分子质量约为15万,而制剂2的峰位分子质量约为42万,两者差别巨大。因此,可推测制剂1吸收快,在体内分布利用也快<sup>[5]</sup>。作为一种大分子多聚物的注射液,羧基麦芽糖铁注射液与右旋糖酐铁注射液一样,其分子质量的大小与产品的致敏性以及体内吸收和分布有直接关系。一般不建议样品的分子质量过大,因为会增加其在体内安全性方面的风险。

由于2015年版《中国药典》(二部)<sup>[1]</sup>的右旋糖酐原料和注射液标准中只规定测定右旋糖酐的分子质量与  $D$ ,而2009版《英国药典》<sup>[2]</sup>未对分子质量与  $D$  进行规定。《中国药典》的方法为将右旋糖酐铁水解,测定右旋糖酐的分子质量。右旋糖酐本身为葡萄糖聚合物,水解是否对其结构产生影响、水解前后的分子质量是否一致、不同的络合工艺在此水解条件下是否完全,有待研究。进口药品标准考察的是整个右旋糖酐铁络合物的分子质量,从对人体组织吸收的角度看,更合理些<sup>[6]</sup>。另外,由于各个生产企业工艺控制的差异,仅仅通过控制起始原料的分子质量,应不能完全控制最终产品右旋糖酐铁的分子质量的范围<sup>[7-8]</sup>。同理,羧基麦芽糖铁作为右旋糖酐铁的升级换代产品,其  $M_w$  与  $D$  仍然是其质量控制的重要指标,故建议在厂家生产羧基麦芽糖铁原料及注射液时应由厂家自行增加  $M_w$  与  $D$  项的检测,以更好地控制产品质量,降低其安全性风险。

## 4 结语

目前供临床使用的静脉补铁剂有以下7种:高分子右旋糖酐铁、低分子右旋糖酐铁、葡萄糖酸钠铁、蔗糖铁、羧基麦芽糖铁、Ferumoxytol、Iron isomal-toside 1000。所有的静脉补铁剂均为胶体溶液,化学机构大体相近,均由铁-碳水化合物纳米微

粒组成,微粒中心为氢氧化铁核心,不同的糖类配体包裹形成外壳,糖类配体外壳可以稳定铁核心,控制铁的释放,维持微粒处于悬浮的胶体状态。核心大小的不同及糖类配体构成、密度上的差异决定了不同铁剂的药理学的不尽相同<sup>[9]</sup>。所以,  $M_w$  与  $D$  将成为该类药物最重要的质量控制指标之一。黄一新等<sup>[10]</sup>报道,静脉铁剂在治疗血液透析贫血患者铁缺乏时安全有效,并优于口服铁剂<sup>[10]</sup>;徐维国等<sup>[11]</sup>报道,静脉注射右旋糖酐铁可有效纠正消化性溃疡出血致缺铁性贫血患者的铁缺乏、提高铁利用率,且不良反应发生率低、患者依从性好<sup>[11]</sup>。相信随着新型静脉补铁剂不断进入国内外临床,其今后会有更加广阔的应用前景<sup>[8]</sup>。

综上所述,该方法精密度、稳定性、重复性、专属性和耐用性均较好,且操作简便,可用于羧基麦芽糖铁  $M_w$  和  $D$  的检测。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:171-172.
- [2] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia: Volume II*:2000[M].London: the Stationery Office, 2009:2 040-2 041.
- [3] 程春雷,范治云,祝清芬,等.右旋糖酐铁注射液不良反应文献分析[J].中国药业,2013,22(8):79.
- [4] 杨立伟,肖树雄,谢海燕,等.凝胶色谱法测定参芪扶正注射液中的高分子物质[J].中国药房,2011,22(15):1 400.
- [5] 章蕴毅,李佩芬,杜一鸣,等.2种右旋糖酐铁给药后的家兔体内血清铁浓度及毒性比较[J].中国新药与临床杂志,2005,24(6):444.
- [6] 万丹晶,陈妙芬,陈钢.右旋糖酐铁注射液峰位相对分子质量和重均相对分子质量的HPGPC测定[J].药物分析杂志,2007,27(5):708.
- [7] 翟晨溟,陈东英,邵尽.右旋糖酐铁注射液中右旋糖酐铁峰位相对分子质量的测定[J].中国新药与临床杂志,2005,24(6):438.
- [8] 范慧红,刘金秀,徐康森.高效凝胶渗透色谱法在右旋糖酐铁质控中的应用[J].药物分析杂志,2000,20(4):254.
- [9] 毛凯,马怡璇,潘红春,等.新型静脉补铁剂的研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(6):659.
- [10] 黄一新,张政,黄振飞,等.静脉注射右旋糖酐铁优于口服琥珀酸亚铁治疗血液透析铁缺乏贫血[J].中国新药与临床杂志,2003,22(7):420.
- [11] 徐维国,崔蓉,冷小辉.静脉用右旋糖酐铁注射液治疗消化性溃疡出血患者缺铁性贫血的临床研究[J].四川省卫生管理干部学院学报,2007,26(4):241.

(收稿日期:2015-12-17 修回日期:2016-05-06)

(编辑:余庆华)