

高效体积排阻色谱-示差折光检测器-多角激光光散射仪联用测定右旋糖酐70原料药的分子质量

阚微娜*,滕艳坤,杨宏伟(辽宁省食品药品检验所,沈阳 110023)

中图分类号 R927.2;R973*.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0843-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.26

摘要 目的:建立测定右旋糖酐70原料药的分子质量的方法。方法:采用不需要对照品的高效体积排阻色谱-示差折光检测器-多角激光光散射仪(HPSEC-RID-MALLS)联用法,另与《中国药典》方法即HPSEC-RID法(采用3种来源对照品)测定3批样品重均分子质量(M_w)的结果进行比较。两种方法色谱柱均为TSK-GEL G4000SWXL凝胶色谱柱,流动相分别为0.2 mol/L氯化钠水溶液和0.71%硫酸钠水溶液(均含0.02%叠氮化钠)。结果:采用HPSEC-RID-MALLS法与采用其中2种来源对照品的HPSEC-RID方法测得的样品 M_w 结果相近。结论:HPSEC-RID-MALLS法不需要对照品,可直接测定样品的分子质量,方法更简便、快速,且结果准确。

关键词 高效体积排阻色谱;示差折光检测器;多角激光光散射仪;右旋糖酐70;分子质量

Determination of Molecular Weight of Dextran 70 Raw Material by High Performance Size Exclusion Chromatography with Differential Refraction Detector and Multi-angle Laser Light Scatter

KAN Wei-na, TENG Yan-kun, YANG Hong-wei (Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of molecular weight of dextran 70 raw material. METHODS: High-performance size exclusion chromatography-differential refraction detector-multi-angle laser light scatter (HPSEC-RID-MALLS) were applied together. Molecular weight (M_w) of 3 batches of samples were determined by HPSEC-RID with substance control from 3 sources stated in *Chinese Pharmacopoeia*. The determination of 2 methods were performed on TSK-GEL G4000SWXL gel column with 0.2 mol/L sodium chloride solution and 0.71% sodium sulfate solution (all containing 0.02% sodium azide) as mobile phase, respectively. RESULTS: M_w of HPSEC-RID-MALLS was similar to that of HPSEC-RID with substance control from 2 sources. CONCLUSIONS: HPSEC-RID-MALLS method can be used to detect absolute molecular weight of sample directly without substance control, and it is simpler, rapider and more accurate.

KEYWORDS High performance size exclusion chromatography; Differential refraction detector; Multi-angle laser light scatter; Dextran 70; Molecular weight

右旋糖酐,又名葡聚糖,是一种由若干葡萄糖脱水形成的高分子聚合物,普遍应用于医药领域,可提高血浆胶体渗透压,吸收血管外的水分以补充血容量,从而维护血压扩充血容量的强度。临床医学上应用最普遍的右旋糖酐有3种,根据分子质量大小分为右旋糖酐20、右旋糖酐40和右旋糖酐70,均系蔗糖经肠膜状明串珠菌L.-M-1226号菌发酵后生成的高分子葡萄糖聚合物,再经处理精制而得^[1]。分子质量及其分布是表征右旋糖酐的重要参数。右旋糖酐70是目前公认的优良血浆代用品之一,《中国药典》要求右旋糖酐70的重均分子质量(M_w)应为64 000~76 000^[2]。

国际常见药典中^[2-4]均规定了右旋糖酐70的分子质量的测定方法,即高效体积排阻色谱法(HPSEC)。《中国药典》方法中需要使用不同分子质量的对照品,采用示差折光检测器(RID),通过GPC分析软件,绘制标准曲线测定样品的分子质量及其分布。笔者发现,使用不同来源的对照品测定同一右旋糖酐70的分子质量,结果会出现一定的差别。为此,笔者试图建立一种不需要对照品即可测定右旋糖酐分子质量的HP-

SEC方法。经不断试验,笔者最终建立了HPSEC法与RID、多角激光光散射仪(MALLS)联机测定的方法,其中RID仍然为第一检测器,MALLS为第二检测器。由于MALLS为分子质量响应型检测器,因此不需要已知分子质量的对照品校正色谱柱,可直接测得样品的绝对分子质量^[5]。笔者使用建立的方法对3批右旋糖酐70原料药进行了测定,并将结果与采用《中国药典》方法^[2]分别用3种不同来源对照品计算得到的样品分子质量结果进行了比较,结果表明建立的方法高效、准确,可以直接测定样品的分子质量。

1 材料

1.1 仪器与软件

LC-20A型HPLC仪,包括LC-20A泵、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、RID-10A RID(日本岛津公司);18角度激光光散射仪(波长:632.8 nm)、ASTRA4.90.08软件(美国Wyatte公司);凝胶色谱软件GPC 2010版(北京龙智达公司)。

1.2 药品与试剂

右旋糖酐分子质量对照品[中国食品药品检定研究院(以下简称中检院),批号分别为:140641-201002、140642-201002、140643-201002、140644-201002、140645-201002,峰位分子质

* 主管药师,硕士。研究方向:生化药物分析。电话:024-25425029。E-mail:kanweina@126.com

量 M_p 分别为: 10 000、21 400、41 100、84 400、133 800]; 葡聚糖分子质量对照品 P82 (日本 Shodex 公司, 批号: 51104, M_p 分别为: 22 800、47 300、112 000、212 000); Fluka 葡聚糖分子质量对照品 (美国 Sigma 公司, 批号: BCBG8021V, M_p 分别为: 23 800、48 600、80 900、147 600、273 000); 右旋糖酐 70 原料药 [山东某药业公司, 批号: A(120501)、B(110701)、C(100601)]; 叠氮化钠、无水硫酸钠、氯化钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPSEC-RID-MALLS 方法

2.1.1 供试品溶液的配制。取供试品适量, 加流动相适量稀释至 10 mg/ml。

2.1.2 色谱条件。色谱柱: TSK-GEL G4000SWXL (30 cm × 7.5 mm, 5 μm); 流动相: 0.2 mol/L 氯化钠水溶液 (内含 0.02% 叠氮化钠), 流速: 0.8 ml/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl; 采集时间: 20 min。RID 常数: 4.88×10^4 ; dn/dc 值: 0.135 ml/g; 延迟体积: 0.4 ml。分析软件为 ASTRA4.90.08。

供试品溶液 (批号: A) 色谱图见图 1。

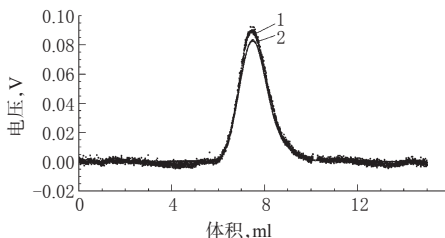


图 1 样品 A 色谱图

1. RID 谱图; 2. MALLS 谱图

Fig 1 Chromatograms of sample A

1. RID chromatograms; 2. MALLS chromatograms

2.1.3 精密度试验。称取 M_w 为 80 900 的 Fluka 葡聚糖分子质量对照品 10 mg, 加流动相 1 ml, 制成 10 mg/ml 的标准溶液, 放置过夜。精密量取 0.1 ml, 注入色谱仪, 连续进样 5 次, 测得 M_w 平均值为 81 000, RSD=0.66% ($n=5$), 平均值与标准值 (80 900) 之差为 100, 相对误差为 0.13%。

2.1.4 重复性试验。称取右旋糖酐 70 原料药 (批号: A) 50 mg, 加流动相 5 ml 溶解, 共配制 6 份, 放置过夜; 精密量取 20 μl, 注入色谱仪。结果, 6 份样品 M_w 平均值为 65 680, RSD=0.9% ($n=6$); 10% 大分子部分重均分子质量 (M_{10}) 平均值为 121 600, RSD=1.1% ($n=6$); 10% 小分子部分重均分子质量 (M_{90}) 平均值为 47 670, RSD=0.95% ($n=6$)。表明方法重复性良好。

2.1.5 样品分子质量测定。取 3 批样品, 按“2.1.1”项下方法配制供试品溶液, 注入色谱仪, 测定 3 批供试品的 M_w 、 M_{10} 、 M_{90} , 结果见表 1。

表 1 HPSEC-RID-MALLS 法测定 3 批样品分子质量结果 ($n=2$)

Tab 1 Results of molecular weight of 3 batches of samples by HPSEC-RID-MALLS ($n=2$)

样品批号	M_w	M_{10}	M_{90}
A	69 680	121 600	47 670
B	63 190	99 150	42 100
C	68 700	116 100	45 890

2.2 《中国药典》方法 (HPSEC-RID 方法)

2.2.1 色谱条件。色谱柱: TSK-GEL G4000SWXL (30 cm × 7.5 mm, 5 μm); 流动相: 0.71% 硫酸钠水溶液 (内含 0.02% 叠氮化钠), 流速: 0.5 ml/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl; 采集时间: 25 min。分析软件为 GPC。

2.2.2 溶液配制。对照品溶液: 称取 M_p 在 15 000~200 000 之间的 3 种来源对照品约 10 mg, 分别用 1 ml 流动相溶解, 放置过夜, 配制成 3 种来源的对照品系列溶液。供试品溶液: 同“2.1.1”项。

2.2.3 不同来源对照品标准曲线的绘制。取“2.2.2”项下配制的不同来源的对照品系列溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件测定, 并采用 GPC 软件, 以保留时间 (T , min) 为横坐标、分子质量 (M) 的对数为纵坐标, 进行线性回归, 并绘制 3 种来源葡聚糖对照品的标准曲线, 结果 3 种来源对照品线性关系良好, 见表 2。

表 2 3 种来源葡聚糖对照品线性关系

Tab 2 Linear range of 3 brands of dextran standard

来源	M_p	保留时间, min	标准曲线方程	r
Fluka	23 800	17.402	$\lg M = 9.906 - 0.318 6T$	0.999 0
	48 600	16.375		
	80 900	15.637		
	147 600	14.823		
	273 000	14.104		
Shodex 公司	22 800	17.673	$\lg M = 8.946 - 0.259 5T$	0.999 7
	47 300	16.452		
	112 000	15.069		
中检院	10 000	18.757	$\lg M = 9.575 - 0.297T$	0.999 8
	21 400	17.685		
	41 100	16.671		
	84 400	15.635		
	133 800	14.992		

2.2.4 样品分子质量测定。取 3 批供试品, 按“2.1.1”项下方法配制供试品溶液, 注入色谱仪, 分别使用表 2 中的 3 个标准曲线方程计算 3 批样品的 M_w 、 M_{10} 、 M_{90} , 结果见表 3。

表 3 HPSEC-RID 法测定 3 批样品分子质量结果 ($n=2$)

Tab 3 Results of molecular weight of 3 batches of samples by HPSEC-RID ($n=2$)

样品批号	使用 Fluka 对照品			使用 Shodex 公司对照品			使用中检院对照品		
	M_w	M_{10}	M_{90}	M_w	M_{10}	M_{90}	M_w	M_{10}	M_{90}
A	70 700	195 000	17 500	63 700	150 000	17 500	70 000	183 000	16 200
B	64 800	151 000	15 800	62 500	143 000	17 100	64 300	152 000	15 000
C	69 500	181 000	15 700	63 200	147 000	17 200	68 500	171 000	15 000

3 讨论

3.1 不同来源对照品对测定结果的影响

由表 3 数据可知, 采用 Fluka 葡聚糖对照品与中检院右旋糖酐对照品绘制的标准曲线方程分析 3 批样品, 这两种方法的测定结果较为接近; 而采用 Shodex 公司葡聚糖对照品得到的样品的结果偏低, 甚至低于《中国药典》规定的限度^[2], 这为质控结论的判定带来一定的困难。中检院的右旋糖酐对照品与 Fluka 葡聚糖对照品所使用的葡聚糖均为蔗糖经肠膜状明串珠菌 L.-M-1226 号菌发酵后生成的高分子葡聚糖聚合物再经精制而得, 系与右旋糖酐同源的菌株发酵而来, 而 Shodex 公司葡

毛细管气相色谱法测定坎地沙坦酯原料药中8种有机溶剂残留量

冯光玲^{1,2*}, 丁文娟³, 伊星璐^{1,2}, 冯爱国³(1.山东省医药工业研究所, 济南 250101; 2.山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 3.山东临沂动植物园, 山东临沂 276037)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0845-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.27

摘要 目的:建立测定坎地沙坦酯原料药中8种有机溶剂甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与四氢呋喃残留量的方法。方法:采用气相色谱法。色谱柱为Agilent HP-5毛细管柱,以(5%)苯基-(95%)甲基聚硅氧烷为固定液,柱温采用程序升温,氢火焰离子化检测器温度为250℃;载气为高纯N₂;顶空进样,加热温度为100℃,加热时间为30 min。结果:8种有机溶剂在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 9$),平均回收率均为99.6%~100.3%(RSD=0.89%~1.98%, $n=3$);定量限分别为0.09、0.15、0.12、0.3、0.6、0.18、0.45、0.21 ng;检测限分别为0.03、0.05、0.04、0.1、0.2、0.06、0.15、0.07 ng。样品中只检出了丙酮。结论:建立的方法操作简便、精密度高,可有效控制坎地沙坦酯原料药中残留的8种有机溶剂。

关键词 坎地沙坦酯原料药;毛细管气相色谱法;有机溶剂;残留量测定

Determination of 8 Residual Organic Solvents in Candesartan Cilexetil Raw Material by Capillary GC

FENG Guang-ling^{1,2}, DING Wen-juan³, YI Xing-lu^{1,2}, FENG Ai-guo³(1.Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China; 2.Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China; 3. Shandong Linyi Botanical Garden, Shandong Linyi 276037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 8 kinds of residual organic solvents in candesartan cilexetil, such as methanol, ethanol, acetonitrile, acetone, diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate and tetrahydrofuran. METHODS: GC method was adopted. The determination was performed on Agilent HP-5 capillary column with (5%) phenyl-(95%) methylpolysiloxane as fixation fluid by temperature programming. The temperature of flame ionization detector was set at 250℃, and high purity N₂ was used as carrier gas with headspace sampling. The heating temperature was 100℃, and heating time was 30 min. RESULTS: The good linear range of 8 kinds of organic solvents had been obtained ($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 9$) with average recoveries of 99.6%-100.3% (RSD=0.89%-1.98%, $n=3$). The limit of quantification were 0.09 ng, 0.15 ng, 0.12 ng, 0.3 ng, 0.6 ng, 0.18 ng, 0.45 ng and 0.21 ng. The detection limits were 0.03 ng, 0.05 ng, 0.04 ng, 0.1 ng, 0.2 ng, 0.06 ng, 0.15 ng and 0.07 ng, respectively. Only the acetone was detected. CONCLUSIONS: The established method is simple and precise, and it can be used for the control of 8 kinds of residual organic solvents in candesartan cilexetil raw material.

KEYWORDS Candesartan cilexetil raw material; Capillary GC; Organic solvents; Content determination

聚糖对照品使用的葡聚糖来源不清楚,由此初步分析可能是葡聚糖的来源与样品来源有区别而导致测定结果偏低。因此,采用不同来源、不同类别的对照品对样品进行GPC分析时,经普适校正后更为合适。

3.2 HPSEC-RID-MALLS法与HPSEC-RID法结果比较

由表1和表3中的数据可知,采用HPSEC-RID-MALLS法的结果与采用HPSEC-RID法、中检院与Fluka葡聚糖对照品的 M_n 结果相近,但是 M_{10} 、 M_{90} 的结果差别较大。因此,尽管两种方法均采用凝胶色谱分离,但检测和计算的手段完全不同。笔者认为,从原理上讲,HPSEC-RID-MALLS法测定的结果应更接近样品分子质量的真值。

3.3 HPSEC-RID-MALLS法优势

HPSEC-RID-MALLS法不需要对任何标准物质进行校正和标定,具有较高的准确性和重复性,操作简单,可实现连续

性测定,同时还可用于分子质量对照品的标定,因此在质量控制和应用研究中具有更广阔的前景。

参考文献

- [1] 韦肖锋.关于右旋糖酐生产新工艺的探讨[J].企业科技与发展,2012(3):12.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:114.
- [3] 美国药典委员会.美国药典[S].34版.华盛顿:美国药典委员会,2011:2 521.
- [4] 英国药典委员会.英国药典[S].2010年版.伦敦:英国药典委员会,2010:655-656.
- [5] 李京,范慧红.高效体积排阻色谱与多角激光光散射仪联用测定低分子肝素分子量及分子量分布[J].中国药学杂志,2009,44(2):140.

(收稿日期:2013-05-10 修回日期:2013-07-04)

*副主任药师。研究方向:新药药物分析。电话:0531-81213291。
E-mail: jnfengguangling@163.com.cn