

· 国外药品标准信息 ·

高效液相色谱法在美国药典中的应用

齐宗韶(广州市医药学校 广州 510430)

摘要 对 2004 年亚洲版美国药典中 USP(27) 药品各论、营养强化剂和 NF(22) 三部分分别统计分析高效液相色谱法在鉴别、检查和测定中的应用。统计分析各类色谱柱、检测器、检查项目、定量方法和重要色谱条件的选用情况。

关键词 高效液相色谱法; 美国药典

中图分类号: 921.2 文献标识码: B 文章编号: 1009-3656(2007)-5-77-4

The Application of HPLC in the USP27-NF22

Qi Zong-shao(Guangzhou Pharmaceutical School, Guangzhou 510430)

Abstract: Review the application of HPLC in the general official monographs in USP27, dietary supplements and NF22 of USP Asian Edition(2004). Provided the statistics and the analysis about HPLC application in drug identification, test and assay, about Chromatographic packings, detectors, test items, quantitative methods and important chromatographic conditions.

Key words HPLC; USP27-NF22

2004 年亚洲版 USP(27) 和 NF(22) 总共收载有各论 4000 种。其中药品各论(General official Monographs for USP 27) 3606 种; 营养强化剂(Dietary Supplements) 212 种(其中与 USP27 重复的有 111 种, 不重复的单列各论有 101 种); 国家处方集 NF(22) 392 种(其中与 USP27 重复的有 99 种, 不重复单列的各论有 293 种)。上述 3606 种、101 种和 293 种之和刚好为 4000 种。各论在鉴别、检查和测定项目中都广泛深入地应用了高效液相色谱法。营养强化剂中油溶性维生素、水溶性维生素的复方制剂较多, 含量测定选用 HPLC 法的品种数占总数的 83.2%。药品各论选用 HPLC 法测定含量的品种数占总数的 45.2%。为了检查药品的色谱纯度、有关物质、指定杂质的限量、含量均匀度、溶出度、分子量分布和放射化学纯度等项指标, 选用 HPLC 法检查的品种数占药品各论总数的 26.3%。药品各论中选用 HPLC 法进行鉴别、检查和测定的品种数总计 1756 种, 占总数的 48.7%。营养强化剂中选用 HPLC 法进行鉴别、检查和测定的品种数为 86 种, 占总数的 85.1%。足见 HPLC 法在美国药典中的重要作用。该版药典附录中收载有供选用的色谱柱 56 种(L1 柱~L56 柱)。其中有新型键合相: 手性柱、包埋键合相、包覆聚合物和全氟代苯基柱等, 能有效地分离光

学异构体和含双键的不同组分。非极性键合相中还收载有不同烷基混合键合相和引入少量离子交换树脂改进性能的烷基键合相。在各论中许多色谱柱还规定要用封尾技术改进性能。有关检测方法广泛选用了紫外可见检测器, 也应用了示差折光检测器、电化学检测器、荧光检测器和蒸发光散检测器等。有关定量方法广泛应用了峰面积法、外标法, 也应用了内标法、归一化法、自身对照法、峰高法、分子量分布测定法等。HPLC 法在美国药典中的应用有可供借鉴之处。

有关 HPLC 法的应用品种数和所占百分比见表 1。有关色谱柱的选用情况见表 2。有关检测器的选用情况见表 3。有关定量方法的选用情况见表 4。有关检查条目的选用情况见表 5。有关其他色谱条件的选用情况见表 6。

表 1 HPLC 法在 USP 中的应用品种数

	USP(27) 药品各论		营养强化剂		NF(22)	
	品种数	百分比	品种数	百分比	品种数	百分比
鉴别	803	22.3%	42	41.6%	4	1.4%
检查	947	26.3%	14	13.9%	19	6.5%
测定	1629	45.2%	84	83.2%	11	3.8%
涉及品种数	1756	48.7%	86	85.1%	22	7.5%

表2 色谱柱选用情况(种次)

		USP(27) 药品各论	营养强化剂	NF(22)
非极性键合相	C18 柱	1432	242	11
	C1 柱	21		
	C3 柱	1		
	C4 柱	2		
	C6 柱	8		
	苯基柱	74		
极性键合相	氨基柱	14	10	
	氰基柱	53		1
	氨基氰基柱	2		
硅胶柱		137	6	
阳离子交换柱		52	3	6
阴离子交换柱		15		
排阻色谱柱		51	1	4
新型固定相	手性柱	4		
	包埋键合相	2		
	包覆聚合物	3		
	全氟代苯基柱	2		
小计		1873	262	22

从表2看出,非极性键合相中C18柱应用最多。药品各论、营养强化剂和NF(22)三项中应用C18柱的共有1685种次,占色谱柱选用种次总数2157种次的78.1%。C18柱是指十八烷基硅烷键合多孔硅胶或陶瓷微球色谱柱(L1柱,选用此柱的有1431种次)、十八烷基硅烷键合全多孔硅胶微球色谱柱(L7柱,选用此柱的有235种次)和十八烷基硅烷键合硅胶薄壳型大球色谱柱(L2柱,19种次)。C1柱、C3柱、C4柱、C6柱和苯基柱分别指二甲基、三甲基、丙基、丁基、己基和苯基硅烷键合多孔硅胶,即L13柱、L16柱、L56柱、L26柱、L15柱和L11柱。美国药典正文各论中选用的非极性键合相类型的色谱柱品种总计9种。极性键合相色谱柱类型的选用了3种(L8柱、L10柱和L18柱),选用了69种次,占色谱柱选用总数的3.2%。选用品种数虽不多,但有特色。例如:氨丙基硅烷键合硅胶柱(L8柱)为强极性柱,氢键结合力强,宜于分离单糖、双糖和多糖。USP(27)用此柱鉴别和测定乳果糖浓溶液和乳果糖溶液两种药品,并检查其中果糖、半乳糖、乳糖和差向乳糖四种糖分的限量。此外,还用于检测蔗糖铝及其片剂中的蔗糖八硫酸铝络合物;用于测定C13尿素、顺铂和注射用顺铂的含量。氰基键合多孔硅胶柱(L10柱)为中等极性柱,对双键异构体或含有不同数量双键的环状化合物有很好的分离能力。USP(27)用此柱检测具有双键的灰黄霉素及其片剂、胶囊剂和混悬液;还用于检测具有双键的硫酸卷曲霉素、心得静、卡马西平、泼尼松龙、马替普林、环吡酮及其制剂的质量;也用于检测含有利福平

的复方片剂。氨基氰基键合多孔硅胶柱(L18柱)用于检测前列地尔注射液和碘普兰(Ioxilan)的质量。表二中硅胶柱为极性吸附色谱柱,共选用了3种(L3柱、L27柱和L4柱)。其中3~10 μ m多孔硅胶柱(L3柱)选用较多(131种次);30~50 μ m多孔硅胶柱(L27柱)和30~50 μ m控制表面孔率硅胶柱(L4柱)选用较少,分别为4种和2种。USP(27)附录中虽然列举了氧化铝柱(L5柱),但正文中未选用。阴、阳离子交换柱用于检测含有电解质制剂的事例较多。阳离子交换柱L17柱和L19柱用于测定复合电解质注射液(型、型)和复合电解质葡萄糖注射液(、型)中的醋酸盐、枸橼酸盐和葡萄糖酸盐含量;还用于检测含有甘露醇或山梨醇的药品。用阳离子交换柱L22和阴离子交换柱L23测定PEG3350电解质口服液中的钾盐、钠盐、氯化物和硫酸盐的含量。用阴离子交换柱L47柱鉴别、检查和测定阿米卡星及其注射液、硫酸阿米卡星、硫酸卡那霉素及其胶囊剂和注射液等6种药品。用阴离子交换柱L48测定硫酸链霉素及其注射液和注射用硫酸链霉素的含量。此外,还用阳离子交换柱L52测定红霉素软膏中红霉素A、B、C的总量。USP附录中刊载了可供选用的离子交换柱17种,正文中选用了13种。排阻色谱柱二羟基丙烷键合多孔硅胶柱(L20柱)用于检查人胰岛素、猪胰岛素和重组人胰岛素等12种药品中高分子量蛋白质的限量。刚性苯乙烯—二乙烯苯共聚物球体柱(L21柱,排阻色谱柱)用于多西环素类(9种)、土霉素类(7种)、红霉素类(4种)等药品的检测。聚甲基丙烯酸酯排阻色谱柱(L38柱)、聚羟甲基丙烯酸酯排阻色谱柱(L39柱)和右旋糖苷键合多孔琼脂糖排阻色谱柱(L54柱)分别用于检查右旋糖苷类药物的分子量分布和测定维生素C注射液的含量。USP正文中共选用了排阻色谱柱7种。新型固定相在USP中的应用值得注意。为了分离和检测光学异构体,USP正文中选用了3种手性柱(L32柱、L45柱和L51柱)检测4种药品的质量。用L-脯氨酸铜络合物柱(L32柱、配体交换柱)检查F18氟代多巴注射液中右旋D型对映异构体的限量。用 β -环糊精手性柱(L45柱、立体空穴柱)检查拉米夫定(Lamivudine)对映异构体的限量。用手性固定相TDPMA柱(L51柱、螺旋型聚合物柱)检查Brinzolamide混悬剂及其滴眼剂中有关化合物A和B的限量。为了控制光学活性药物左去氧麻黄碱(Levmetamfetamine)的质量,用包埋极性基团键合相(L36柱)严格检查其右旋体杂质(S构型)的限量

(0.1%)。为了检查含有利福平、吡嗪酰胺和异烟肼复方制剂的溶出度, 选用了包埋极性基团键合相(L44 柱)。用氧化铝或氧化锆为基质, 键合上聚丁二烯后制成的包覆聚合物固定相, 其稳定性好, 可用碱性流动相分离碱性药物。USP(27) 用聚丁二烯键合 $\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$ 柱(L29 柱) 或聚丁二烯键合氧化锆柱(L49 柱) 检测阿扎红霉素及其胶囊剂和口服混悬用阿扎红霉素 3 种药物的质量。五氟代苯基键合硅胶柱在分离含有羧基或羟基极性化合物方面具有显著优势。USP(27) 选用这种色谱柱(L43 柱) 鉴别、检查和测定紫杉醇(含有多个羟基) 及其注射液的质量。

表3 检测器选用情况(种次、百分比)

	USP(27) 药品各论	营养强化剂	NF(22)
紫外可见检测器	1708(95.8%)	85(90%)	12(54.5%)
示差折光检测器	35(2.0%)	1(1.3%)	10(45.5%)
电化学检测器	26(1.5)		
荧光检测器	13(0.7%)	7(7.4%)	
蒸发光散射检测器		1(1.3%)	

表3 中所列蒸发光散射检测器仅用于测定银杏中萜类内酯的含量。电化学检测器主要用于 PEG3350 电解质口服液、硫酸链霉素、硫酸卡那霉素、阿米卡星和红霉素油膏等药品经离子交换柱分离后有关成分的检测。荧光检测器主要用于核黄素 5-磷酸钠、炔雌醇片、马来酸甲基麦角新碱及其片剂和含有咖啡因药品的检测。示差折光检测器主要用于含有葡萄糖、乳糖、甘露醇和右旋糖苷类药品、卡拉普多片、硫酸铝及其片剂等药品的检测。

表4 检查、测定中选用定量方法的情况(种次、百分比)

	USP(27) 药品各论	营养强化剂	NF(22)
外标法	1374(77.1%)	74(82.2%)	22(73.3%)
内标法	326(18.3%)	12(13.3%)	1(3.3%)
归一化法	59(3.3%)		5(16.7%)
自身对照法	2(0.13%)		2(6.7%)
峰高法	18(1.0%)	4(4.5%)	
分子量分布测定法	3(0.17%)		

从表4 看出峰面积法、外标法选用最多。右旋糖苷 1、右旋糖苷 40 和右旋糖苷 70 三种药品应用了分子量分布测定法。潘生丁和氟甲西丁两种药品在检查色谱纯度时应用了自身对照法。

表5 检查条目的选用情况(种次、百分比)

	USP(27) 药品各论	营养强化剂	NF(22)
色谱纯度	199(18.6%)	3(21.4%)	2(10.5%)
有关物质	190(17.8%)		5(26.3%)
指定杂质	122(11.4%)	4(28.5%)	12(63.2%)
含量均匀度	373(34.9%)		
溶出度或释放度	176(16.5%)	7(50%)	
分子量分布	3(0.28%)		
放射化学纯度	6(0.56%)		

从表5 看出药品各论中收录的用 HPLC 法进行检查的检查条目和检查品种数较多, 对药品质量要求较高。在检查项目中含量均匀度、色谱纯度、溶出度或释放度及指定杂质(即特殊杂质) 等四个项目收录的品种数较多, 在检查指定杂质(特殊杂质) 限量时, 对四环素类、盐酸四环素类、F18 氟代多巴、拉米夫定、醋酸群勃龙(Trenbolone) 等药物检查差向异构体或对映异构体的限量; 检查碘普胺(Iopromide)、噻替吨、盐酸噻替吨、维生素 A 酸、维生素 K₁ 等药品的顺反异构体限量。检查维生素 B₁₂ Co⁵⁷、F18 氯化钠、碘苄胍(Iobenguane I¹²³) 和 Tc⁹⁹ 枸橼酸他莫昔芬等药品的放射化学纯度。这些检查条目和检查方法似有可借鉴之处。

表6 其他色谱条件的选用情况(种次)

	USP(27) 药品各论	营养强化剂	NF(22)
二元梯度洗脱	120	35	
色谱柱控温	226	36	10
加予柱	94		1
色谱柱封尾	33	6	

从表6 看出为了分离成分复杂的药品有一百多个品种选用了梯度洗脱方式, 但绝大多数药品仍然选用等度洗脱方式。为了减少残存游离硅羟基对色谱柱分离效果的干扰, 注意选用了封尾技术。例如, 二乙三胺五醋酸(Pentetic Acid) 在检查杂质限量、琥酸酸辛酯磺酸钠(Docusate Sodium) 溶液及其胶囊在测定含量时要求所用色谱柱是经过高度封尾的。又如, 左旋多巴在测定含量时要求用经过双重封尾的色谱柱。表六中要求封尾的色谱柱 L1 柱有 28 种、L7 柱有 8 种、L10 柱有 3 种。为了保证色谱分离效率, 要求控制色谱柱柱温的品种也较多。

美国药典各论正文中对与 HPLC 法有关的流动相、内标溶液、外标溶液、分离度检测溶液、供试品溶液、色谱系统和测定操作都作了详细叙述。色谱系统和测定操作中对色谱柱的内径、长度、固定相种类、柱温、检定器的类型和条件、流动相的流速、理论板数、分离度、相对保留时间、拖尾因子、测定结果的 RSD 和定量计算公式等都有明显确定。上述规定虽很细致, 但美国药典附录(621) 在有关色谱法系统适用性的阐述中, 重点强调了对分离度、测定结果的 RSD 和拖尾因子这三项的要求。当检测单组分供试品, 只涉及一个主要色谱峰时也可以理论板数 N 代表柱效率, 不再列举对分离度的要求。实践证明在应用 HPLC 法时认真掌握这些关键因素是十分重要的。美国药典收录的个别药品对分离度和柱效率的

要求是十分严格的,可兹参考。如检查碘海索(Iohexol)中有关物质A和C的限量时,要求二者的分离度不得小于20.0。又如对碘普胺及其注射液检查有关物质B限量、检查异构体分布和测定含量时,不仅对有关物质BY1和BY2的相对保留时间提出明确

要求,并规定有关物质BY2异构体的信噪比不得小于20。多数药品在用HPLC法检测时,色谱柱的理论板数达到几百或一、两千即可。但在测定人参皂苷含量时,却要求色谱柱对人参皂苷Rg1和Rb1的柱效率不得小于17000和11000,对柱效率的要求比较高。

(上接第76页)

要求,建议标准采用在瓶体部分精密称取一定量的样品做密度实验。

在药包材注册申报资料的形式审查要点中,建议瓶盖不做鉴别项目检验,或者,如果要做鉴别检验,建议另增加补充规定。

三、密封性

在密封性项下,瓶与盖的扭力有一定的要求,盖直径(mm)最大是40mm,大于40mm的盖没有规定。我省潜江鸿发塑料制品有限公司的瓶盖达到42mm,建议在标准中增加大于40mm盖直径的扭力要求。

四、溶出物试验

65%乙醇、正己烷在实验过程中浸泡24小时很容易挥发,而且需要不断补充溶剂。建议在标准中采用回流装置在规定条件下浸泡24小时。

五、脱色试验

在脱色试验中,规定了酸浸泡、有机溶剂浸泡,没有碱浸泡,建议标准中增加碱浸泡规定。

六、无机盐检查

高密度聚乙烯在GB11116-89项下,技术指标主要是物理性能和材料强度检查^[4],而一般口服液体也没有对无机盐的检查,建议在标准中增加对砷盐、钡盐等有害无机盐的检查,以保证用药安全。

参考文献

- [1] 国家药品监督管理局直接接触药品的包装材料和容器标准汇编 2000: 49~52
- [2] THE MERCK INDEX TWELFTH EDITION 1304~1305
- [3] GB 1033-86 塑料密度和相对密度试验方法 中国标准出版社出版 国家标准局1986-12-30发布
- [4] GB 11116-89 高密度聚乙烯树脂 中国标准出版社出版 中国石油化工总公司1989-03-29批准

2008年《中国药品标准》杂志征订启事

《中国药品标准》杂志是经国家科学技术部批准、国家食品药品监督管理局主管、由国家药典委员会主办的我国第一部在药品标准领域进行报道和交流的学术性期刊,《中国药品标准》杂志的出版发行,为进一步贯彻实施国家药品标准化、促进药品安全有效、质量可控发挥重要的积极作用。该刊于2000年4月18日创刊,刊号为:CN11-4422/R,双月刊,80页,国内外公开发行,全年订价72元。邮发代号:2-509

《中国药品标准》杂志设立的栏目有:综述、论著、标准管理与法规、标准论坛、实验与研究、辅料与包装、标准与临床、标准发布、国外药典信息。适合药品生产企业、药品监督与检验机构、医疗机构、相关仪器设备制造企业、医院药房与社会药店、医药院校与科研机构等领域的从业人员订阅。

联系地址:北京市崇文区法华南里11号楼。邮编:100061

联系电话:(010)67157647 传真:(010)67157648

邮局汇款:

邮编:100061

单位:中国药品标准杂志编辑部

地址:北京市崇文区法华南里11号楼

银行汇款:

开户行:北京市工行崇文区体育馆路分理处

帐号:0200008109089270084

帐户:国家药典委员会