

高效液相色谱法测定特立帕肽含量的方法研究

余邦良, 杨柳*

(海南医学院药学院, 海口 571101)

摘要 目的: 建立 HPLC 测定特立帕肽含量的方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液 (磷酸调节至 pH 4.5) - 乙腈 (75: 25), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 210 nm; 柱温为室温; 进样量 20 μL。结果: 特立帕肽浓度在 0.05 ~ 0.84 mg·mL⁻¹ 范围内具有良好的线性关系, $r = 0.9999$ 。结论: 本方法简便、准确, 灵敏度高, 重现性好, 可用于测定特立帕肽的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 特立帕肽; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0980-03

Study on HPLC determination of teriparatide

YU Bang-liang YANG Liu*

(Pharmacy Department of Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

Abstract Objective To develop an effective method for determination of teriparatide by HPLC. **Methods** Teriparatide was determined on HPLC instrument fixed with a Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was water with 0.05 mol·L⁻¹ KCl (adjusted to pH 4.5 with phosphoric acid) - acetonitrile (75: 25) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; The detector was set at 210 nm; Column temperature was room temperature and the injection volume was 20 μL. **Results** The calibration curve was linear ($r = 0.9999$) within the range of 0.05 - 0.84 mg·mL⁻¹ for teriparatide. **Conclusion** The method is simple, accurate, good sensitive, reproducible and is suitable for the determination of teriparatide.

Key words HPLC; teriparatide; assay

特立帕肽用于绝经后女性骨质疏松症, 能增加患者骨密度并降低脊椎与非脊椎骨折的风险^[1], 而且增加骨密度、减少骨折风险作用强于阿仑膦酸钠^[2]; 同时也可以用于提高男性患有原发性骨质疏松症或性腺功能减退的骨质疏松症的骨量。该药治疗范围包括原发性骨质疏松症, 继发性骨质疏松症和具有骨质疏松引发骨折病史的患者, 或有多种诱发骨折的风险及以往的针对骨质疏松症治疗方法对其失败或无法耐受的患者^[3]。特立帕肽作为一种全新的抗骨质疏松药物, 由美国 Lilly 公司研发成功, 并于 2002 年在美国上市。但目前在我国国内该品种没有上市。本文采用高效液相色谱法测定特立帕肽的含量, 并进行了方法学研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 二极管阵列检

测器, 岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计。特立帕肽对照品购自 American Peptide 公司, 批号 M 09139A1, 含量为 99.7%。特立帕肽原料药由杭州诺泰制药有限公司提供, 批号 090801, 090802, 090803。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 氯化钾为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精确称取样品 5.0 mg 加入 50 mL 量瓶中, 用水定容, 即得 0.1 mg·mL⁻¹ 的特立帕肽溶液。

2.2 对照品溶液的制备 精确称取经五氧化二磷干燥至恒重的特立帕肽对照品 5.0 mg 加入 50 mL 量瓶中, 用水定容, 即得 0.1 mg·mL⁻¹ 的特立帕肽对照品溶液。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 采用 Kromasil

* 通讯作者: Tel: (0898) 66893763 E-mail: yangliu009@126.com

C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液 (磷酸调 pH 至 4.5) - 乙腈 (75:25), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温为室温, 进样量 20 μ L。理论塔板数按特立帕肽峰计算为 30351。在该色谱条件下特立帕肽的保留时间约为 7 min, 见图 1。

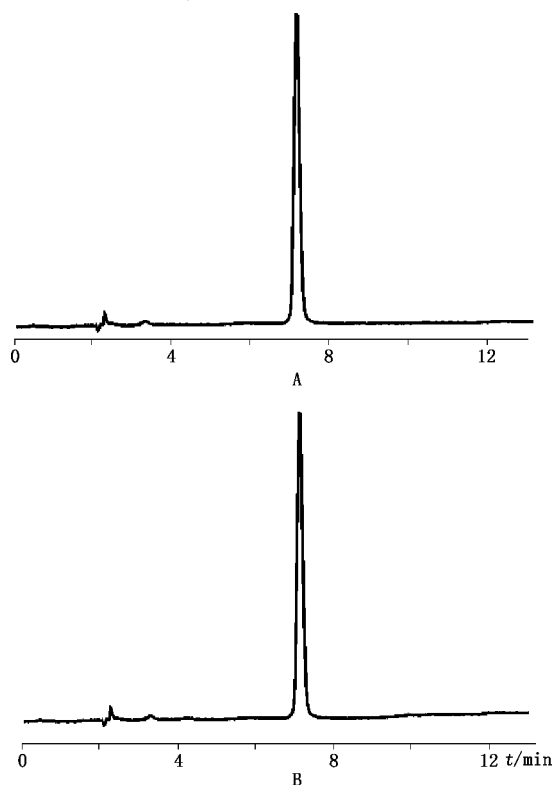


图 1 特立帕肽对照品 (A) 及样品 (B) 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B) of teriparatide

2.4 线性关系考察 精密称取对照品适量, 用水溶解并稀释成浓度为 0.84, 0.42, 0.21, 0.1, 0.05 mg·mL⁻¹, 各精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。以进样量 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为:

$$Y = 1.367 \times 10^4 X - 1.632 \times 10^2 \quad r = 0.9999$$

特立帕肽浓度在 0.05~0.84 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密量取对照品溶液 20 μ L, 照上述色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积。峰面积的 RSD 为 0.13%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一批号的特立帕肽原料药适量, 共 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 各进样 20 μ L, 测定峰面积并计算含量。结果平均含量为 99.0%, RSD 为 1.2%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取样品适量, 加水配制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 分别于配制溶液后第 0, 2, 4, 6, 12 h 各进样 20 μ L 分析。峰面积的 RSD 为 0.34%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 含量测定 取 3 批样品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 各进样 20 μ L, 测定峰面积。另取按“2.2”项下方法配制的对照品溶液 20 μ L 进样, 同法测定。按外标法以峰面积计算含量。每批样品平行测定 3 份。3 批样品的含量分别为 99.1%, 99.0%, 99.8%; RSD 分别为 0.62%, 0.53%, 0.41%。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 利用紫外检测器在 200~400 nm 波长范围内扫描, 结果表明特立帕肽在 210 nm、280 nm 波长处均有吸收峰。根据文献报道^[4], 多肽类样品的检测波长多采用 210 nm 或 214 nm, 故选择测定波长为 210 nm。

3.2 流动相的选择

梁成昱等人^[5]采用流动相 A: 0.1% TFA 水溶液, 流动相 B: 0.1% TFA 的乙腈-水 (95:5) 溶液, 梯度洗脱: 0% → 100% B (0~40 min) 在波长 214 nm 处测定特立帕肽的含量, 但该方法所使用的流动相 pH 实际上小于 2, 超过一般反相色谱柱的 pH 使用范围 2~8^[6], 因而对色谱柱损害较大; 同时该方法采用梯度洗脱, 对色谱柱要求较高; 所需洗脱时间长, 主峰出峰时间为 25 min 左右, 全程洗脱 40 min。采用在水相中加入中性盐氯化钾, 并用磷酸调 pH, 等度洗脱, 大大缩短了分析时间, 而且能满足系统适用性要求。因此用此流动相进行实验。

3.2.1 流动相 pH 的影响 特立帕肽对酸较稳定, 对碱不稳定^[5], 将流动相中水相 (0.05 mol·L⁻¹ 氯化钾溶液) 的 pH 用磷酸分别调至 2.0, 4.5, 6.0 考察色谱行为, 结果表明 pH 在 4.5 时拖尾因子最小, 分离效果最好。

3.2.2 流动相中有机溶剂浓度的影响 流动相中乙腈量为 10% 时, 主峰保留时间较长, 这样不仅浪费时间, 而且也浪费昂贵的有机流动相; 而乙腈量增加到 40% 时, 主峰保留时间太短, 主峰理论塔板数达不到要求, 且不利于杂质的分离。当乙腈量为 25% 时, 保留时间适中, 主峰理论塔板数符合要求。故确定水相与乙腈相比比例为 75:25。

参考文献

1 Anastasiadis AD, Goulis DG, Polyzos SA, et al Head-to-head

- comparison of risedronate vs teriparatide on bone turnover markers in women with postmenopausal osteoporosis: a randomised trial. *Int J Clin Pract*, 2008, 62(6): 919
- 2 Keaveny TM, Donley DW, Hoffmann PF, *et al* Effects of teriparatide and alendronate on vertebral strength as assessed by finite element modeling of QCT scans in women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2007, 22(1): 149
 - 3 Kaufman JM, Orwoll ES, Goemaere S, *et al* Teriparatide effects on vertebral fractures and bone mineral density in men with osteoporosis: treatment and discontinuation of therapy. *Osteoporos Int*, 2005, 16(5): 510
 - 4 Kamp RM, Choli-Papadopoulou T. Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization and Microsequencing(蛋白质结构分析: 制备、鉴定和微量测序). Translated by SHI Yun-yu and RAO Zi-he(施蕴渝, 饶子和译). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002: 50
 - 5 LIANG Cheng-gang(梁成罡), LI Ke-jian(李克坚), ZHANG Hui(张慧), *et al* Quality research of the recombinant human parathyroid hormone(重组人甲状旁腺激素的质量研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(2): 215
 - 6 ChP(中国药典). 2010 Vol II(二部): Appendix 29

(本文于 2010 年 6 月 28 日收到)

WHO 抗疟药品质量控制项目专家访问中国食品药品检定研究院

2011 年 4 月 18~21 日, 中国食品药品检定研究院(简称中检院)接待了来访的 WHO 抗疟药品质量控制项目专家 Dr Souly Phanouvong 一行, 活动分为访问中检院和云南省实地调研评估两部分。

访问中检院期间, 双方分别就相互介绍内容中各自感兴趣的方面进行了深入交流, Dr Souly Phanouvong 尤其对药品检测近红外模型的应用和快速检测技术应用情况表示出了浓厚的兴趣, 双方围绕将药品快速检测技术纳入此次待评估合作项目的可行性进行了探讨。实地调研评估中, 听取云南省疟疾防控、WHO 云南省抗疟药品质量监控项目执行情况及云南省对进一步开展 WHO 抗疟药品质量控制项目意见的汇报; 听取了昆明制药集团发展情况、抗疟药品生产质量保证体系及抗疟药品海外市场开拓方面的汇报; 还分别就药品经营质量管理、医疗机构疟疾病例处置、抗疟疾药品管理等进行了交流。

Dr Souly Phanouvong 代表 WHO 表明了对将中国纳入湄公河次区域抗疟药及其他抗感染药品质量提高项目具有较为浓厚的兴趣, 但同时提出, 如果中国加入此项目, 在项目执行的内容上不要与全球基金框架下抗疟药质量保证项目内容重复。中方对 WHO 的积极邀请表示感谢, 同时建议 WHO 按照国家食品药品监督管理局开展国际合作项目的通用程序, 直接与国家食品药品监督管理局国际合作司联系开展项目合作事宜。

详见 www.nicbpb.org.cn