

反相离子对色谱法测定脱氧精胍菌素药物中的主成分

程晓昆, 王娅莉, 张惠敏, 牛长群*

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 河北 石家庄 050015)

摘要: 建立了反相离子对色谱法分离测定脱氧精胍菌素药物中主成分的方法。分别考察了色谱柱类型、离子对试剂种类及浓度、缓冲盐浓度和流动相 pH 值等参数对实验结果的影响。确定了分离脱氧精胍菌素的最佳条件: C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以 5 mmol/L 磷酸氢二钾水溶液 (含 5 mmol/L 戊烷磺酸钠, pH 3.6 ± 0.3) - 乙腈 (90:10, v/v) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 210 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 20 μL。该方法实现了对脱氧精胍菌素的良好分离, 且线性关系良好, 检出限可达 0.5 mg/L。

关键词: 反相高效液相色谱法; 离子对试剂; 脱氧精胍菌素; 药物

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)12-1292-03

Determination of a major constituent in deoxyspergualin drug by reversed-phase ion-pair chromatography

CHENG Xiaokun, WANG Yali, ZHANG Huimin, NIU Changqun*

(North China Pharmaceutical Group New Drug Research and Development Co., Ltd, Shijiazhuang 050015, China)

Abstract: A method was established for the determination of deoxyspergualin using reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC). Several parameters, such as the chromatographic column, the types and concentration of ion-pair reagents, the concentration of the buffer and the pH value of the mobile phase were evaluated. The optimal separation conditions were as follows: C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); mobile phase, 5 mmol/L di-potassium hydrogen phosphate (containing 5 mmol/L 1-pentanesulfonic acid sodium, pH 3.6 ± 0.3) - acetonitrile (90:10, v/v); flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, 210 nm; column temperature, 30 °C; injection volume, 20 μL. Under the optimized experimental conditions, good linear relationships was obtained and the limit of detection for deoxyspergualin was 0.5 mg/L.

Key words: reversed-phase ion-pair chromatography (RP-IPC); ion-pair reagents; deoxyspergualin (DSG); drug

脱氧精胍菌素 (deoxyspergualin, DSG) 是一种全新的免疫抑制剂^[1], 它可以有效地阻止移植器官排异, 逆转急性排异反应, 且副反应少, 毒性低^[2-5]。临床已试用于各种急性、慢性和复发性排异反应的预防和治疗, 应用前景十分广阔。为了完善合成及制剂工艺的研究, 并将该新药尽快推向市场, 对其建立准确、可靠的分析方法和质量控制标准具有重要的意义。

DSG 的结构式见图 1。由于 DSG 的极性很大, 使用普通的反相色谱分离测定很困难。如果采用正相色谱法则要使用大量有机试剂, 污染环境, 影响人

体健康。因此, 本实验采用反相离子对色谱法对 DSG 进行测定。反相离子对色谱法兼有反相色谱和离子色谱共同的优点, 操作简单、分离效率高^[6], 近年来, 广泛应用在药物、化妆品、生化等众多领域^[7-10]。

目前, 国内外对 DSG 的研究多为其药理机制方面的研究^[11-14], 尚未见对其分析方法的报道。本文利用反相离子对色谱法对其进行分析研究, 有效解决了其在反相色谱柱上不保留的问题, 且分析成本低、速度快、环境污染小, 为 DSG 质量标准的建立提供了一个简便、有效、可靠的分析方法。

* 通讯联系人: 牛长群, 正高级工程师, 主要从事新药研究开发工作。Tel: (0311) 86993040, E-mail: niuchangqun@126.com.
收稿日期: 2012-08-24

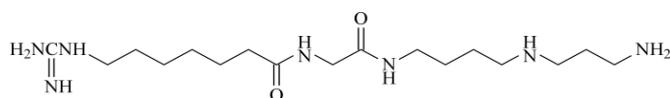


图 1 DSG 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of deoxyspergualin (DSG)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Alliance 2010 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); DSG 对照品(含量 100%)和样品均由华北制药集团新药研究开发有限责任公司提供; 辛烷磺酸钠、己烷磺酸钠、戊烷磺酸钠(分析纯, 山东禹王实业有限公司); 乙腈(色谱纯, Thermo Fisher Scientific 公司); 磷酸氢二钾(分析纯, 天津市化学试剂六厂); 磷酸(分析纯, 天津市瑞金特化学品有限公司); 超纯水(Millipore 超纯水仪制备)。

1.2 溶液的配制

精密称取 DSG 对照品适量, 用超纯水配制质量浓度为 1 g/L 的对照品溶液。精密称取供试品适量, 用超纯水配制质量浓度为 1 g/L 的供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL, 用超纯水稀释定容至 100 mL, 配制成 10 mg/L 的自身对照溶液。

1.3 色谱条件

采用 Gemini C₁₈ 色谱柱(Phenomenex 公司, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 5 mmol/L 磷酸氢二钾水溶液(内含 5 mmol/L 戊烷磺酸钠, 用磷酸调至 pH 3.6 ± 0.3) - 乙腈(90:10, v/v), 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

实验分别考察了 Agela HILIC C₁₈ 柱、资生堂公司的 AQ C₁₈ 柱和氨基柱等不同型号的极性色谱柱对 DSG 的分离效果。结果表明, Agela HILIC C₁₈ 柱、资生堂公司的 AQ C₁₈ 柱和氨基柱等均不适合 DSG 的分离。

由于 DSG 为长链强极性化合物, 在普通的 C₈ 和 C₁₈ 柱上均不能被有效保留, 因此本文采用在色谱系统中加入离子对试剂的方法改善分离效果。实验以普通 C₁₈ 柱为固定相, 在流动相中加入离子对试剂, 对其进行分离分析。

2.2 离子对试剂种类及浓度的选择

在其他条件不变的情况下, 实验分别考察了浓

度均为 5 mmol/L 的辛烷磺酸钠、己烷磺酸钠、戊烷磺酸钠对分离效果的影响。如图 2 所示, 当以辛烷磺酸钠为离子对试剂时, 色谱峰严重前沿; 当以己烷磺酸钠为离子对试剂时, DSG 峰保留时间约为 14 min, 拖尾因子(*T*)为 1.08, 柱效(*n*)为 6 000 理论塔板/m; 当以戊烷磺酸钠为离子对试剂时, DSG 峰保留时间约为 11 min, 拖尾因子为 1.05, *n* 为 8 000 理论塔板/m。因此, 选择戊烷磺酸钠为本实验的离子对试剂。

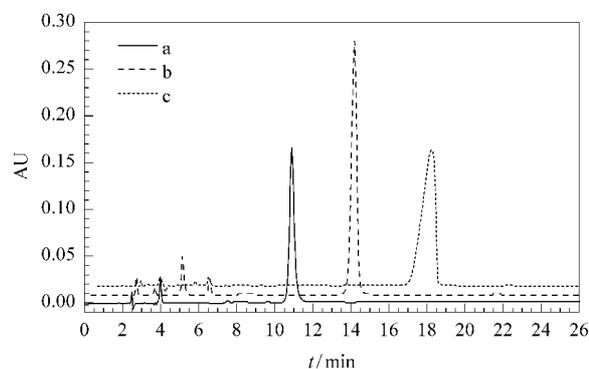


图 2 不同离子对试剂分离 DSG 的 HPLC 谱图

Fig. 2 Chromatograms of DSG separated by three ion-pair reagents

a. 1-pentanesulfonic acid sodium; b. 1-hexanesulfonic acid sodium; c. 1-octanesulfonic acid sodium.

另外, 实验考察了 3 种离子对试剂在浓度分别为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时对 DSG 的保留时间和分离情况的影响。在本实验中, 随离子对浓度的增加, DSG 峰保留时间增长; 但离子对浓度的增加, 对仪器和色谱柱均有不利的影响, 因此选择离子对浓度为 5 mmol/L。

2.3 缓冲液浓度的选择

固定其他实验条件不变, 当缓冲液浓度增加时, 离子强度增加, 流动相洗脱能力增强, 色谱峰保留时间缩短。但如果缓冲液浓度太高, 会影响色谱柱寿命。当磷酸二氢钠浓度为 5 mmol/L 时, 主峰保留时间较短, 而且峰形对称, 拖尾因子为 1.05。因此选择本实验的缓冲盐浓度为 5 mmol/L。

2.4 流动相 pH 值对分离的影响

在以上实验条件优化的基础上, 实验考察了流动相 pH 值对 DSG 分离的影响。随着 pH 值增加, DSG 峰保留时间增加, 拖尾因子由 0.64 递变至

2.01。在 pH 3.6 ± 0.3 范围内,拖尾因子为 0.94 ~ 1.07,色谱峰对称性良好。因此选择 pH 3.6 ± 0.3 作为本实验的分离条件。

2.5 柱温的选择

实验中考察了柱温分别为 30 °C、40 °C 和 50 °C 时对分离的影响。结果发现,随柱温升高,色谱峰保留时间缩短,但柱效反而降低,结果见图 3(以辛烷磺酸钠作离子对试剂为例)。这可能与离子对色谱作用机理的多样性^[6]有关,因此选择 30 °C 作为本实验的最佳柱温。

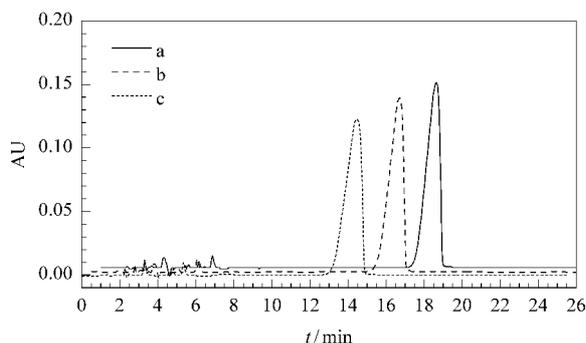


图 3 柱温对 DSG 保留时间和分离的影响

Fig. 3 Effect of column temperature on the retention time and separation of DSG

a. 30 °C; b. 40 °C; c. 50 °C.

Ion-pair reagent: 1-octanesulfonic acid sodium.

2.6 线性关系和检出限

取 DSG 对照品适量,配制质量浓度依次为 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 g/L 的标准溶液,记录色谱图。以质量浓度(X , g/L)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明,在 0.05 ~ 2.0 g/L 范围内,DSG 的浓度与色谱峰面积之间呈良好的线性关系,线性方程为 $Y = 5\,718\,117.78X + 27\,068.61$,相关系数(r^2)为 1.00($n=6$)。

将 DSG 对照品溶液稀释至一定浓度,按照信噪比为 3($S/N=3$) 计算,方法的检出限为 0.5 mg/L。

将 DSG 对照品溶液重复进样,其日间($n=6$)和日内($n=6$)峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 3.0% 和 2.6%。

2.7 样品分析

按 1.3 节的色谱条件,分别对 3 批(060801、060802、060803) DSG 样品($n=2$)进行了含量及有关物质检查。实验结果(见表 1)表明,3 批样品中脱氧精胍菌素的含量均不低于 98.5%,符合原料药的质量要求。

表 1 样品中脱氧精胍菌素含量及有关物质的测定($n=2$)

Table 1 Contents of deoxyspergualin and related substance in real samples ($n=2$)

Lot number	Content/%	Related substance/%
060801	98.8	1.32
060802	98.6	1.41
060803	98.9	1.35

3 结论

目前,国内外尚未见对脱氧精胍菌素分析方法的报道。本文采用反相离子对色谱法对脱氧精胍菌素进行了分离分析,并对 3 批原料药样品的含量和有关物质进行了测定。实验结果表明,该分析方法测定准确、操作方便、成本较低,为合成工艺、制剂和质量研究提供了可靠依据,对保证产品的安全有效性具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Birck R, Drexler J, Hotta O, et al. China Patent (R·伯克, J·德莱克斯勒, 堀田修, 等. 中国专利), 00805578.5. 2005-05-04
- [2] Liu L, Gong L. Acta Acad Med Nei Mongol (刘琳, 龚莉. 内蒙古医学院学报), 2008, 30(6): 476
- [3] Xu K F, Liu C. Current Immunology (徐宽枫, 刘超. 现代免疫学), 2006, 26(1): 85
- [4] Zhang Y, Wang M W. Chinese Journal of New Drugs (张亚, 王明伟. 中国新药杂志), 2005, 14(9): 1109
- [5] Kimura Y, Yagi T, Iwagaki H, et al. J Int Med Res, 2001, 29: 214
- [6] Zou H F, Zhang Y K, Hong M F, et al. Acta Chimica Sinica (邹汉法, 张玉奎, 洪名放, 等. 化学学报), 1994, 52: 1106
- [7] Pang Y H, Liu M Y, Liu S Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (庞艳华, 刘名扬, 刘淑艳, 等. 色谱), 2011, 29(10): 1027
- [8] Chen B L, Zhu M, Huang W G, et al. Drug Standards of China (陈碧莲, 祝明, 黄卫国, 等. 中国药品标准), 2011, 12(2): 111
- [9] Luo X F, Chen R, Fu J J, et al. Chinese Journal of Chromatography (骆雪芳, 陈蓉, 付静静, 等. 色谱), 2007, 25(6): 814
- [10] Zhu W H, Wu F C, Huang T L. Chinese Journal of Chromatography (朱维晃, 吴丰昌, 黄廷林. 色谱), 2008, 26(2): 237
- [11] Floßmann O, Jayne D R W. Rheumatology, 2010, 49: 556
- [12] Saiga K, Yoshida M, Nakamura I, et al. Int Immunopharmacol, 2008, 8: 1183
- [13] Wu G, Korsgren O, Sun S, et al. Xenotransplantation, 2003: 10: 214
- [14] Ishida H, Tanabe K. Ther Clin Risk Manag, 2008, 4(3): 641