

◇ 药物分析 ◇

离子色谱法测定药用辅料 β -环糊精的有关物质

靳贵英, 王淼, 王彩媚

(广东省药品检验所辅料室, 广东 广州 510180)

摘要:目的 建立测定 β -环糊精中有关物质 α -环糊精和 γ -环糊精的离子色谱方法,并用质谱进行验证。方法 采用离子色谱法,CarPac PA 200 离子柱,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,安培检测器,金电极为工作电极,Ag/AgCl 为参比电极。高分辨质谱法采用电喷雾电离模式,离子阱扫描范围为 300~1 400。**结果** α -环糊精和 γ -环糊精的检出限为 0.2 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限分别为 0.4 和 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用离子阱质谱法确认了 α -环糊精和 γ -环糊精,结果与离子色谱相一致。所有样品均检出 γ -环糊精,同时探讨了其限量标准,为该品种标准提高和风险监控提供了技术参数。**结论** 该方法快速、有效,可用于 β -环糊精中有关物质的检测。**关键词:** β -环糊精;有关物质; α -环糊精; γ -环糊精;离子色谱法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.007

Determination of related substances in pharmaceutical excipient β -cyclodextrin using ion chromatograph

JIN Guiying, WANG Miao, WANG Caimei

(Guangdong Institute for Drug Control, Excipients Department, Guangzhou, Guangdong 510180, China)

Abstract: Objective To establish the ion chromatograph for the determination of related substances α -, γ -cyclodextrin in excipient β -cyclodextrin. Mass spectrometry is used to confirm impurity. **Methods** Using ion chromatograph with ionic columns of CarPac PA 200 at a column temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$. Amperometric detector was used, while Au as work electrode and Ag/AgCl as reference electrode. A high resolution mass spectra is used with electrospray ionization mode. Ion trap scanning range is 300-1 400. **Results** The limits of detection of α -, γ -cyclodextrin were 0.2 and 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The limit of quantification of α -, γ -cyclodextrin were 0.4 and 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. α -cyclodextrin and γ -cyclodextrin were confirmed by ion trap mass spectrometry. The results were consistent with those of ion chromatography. The study showed that all samples contain γ -cyclodextrin. In addition, the limitation of the related substances in the excipient was discussed. Those are the important technical parameters for the standard improvement and risk monitor. **Conclusion** This method is rapid and effective for the determination of related substance of β -cyclodextrin.

Key words: β -cyclodextrin; Related substance; α -cyclodextrin; γ -cyclodextrin; Ion chromatograph

环糊精是由芽孢杆菌属所产生的葡萄糖基转移酶作用于淀粉而生成的一类以 α -1,4 糖苷键结合的环状低聚糖,具有特殊的中空笼形结构,笼内具有非极性的疏水空穴,笼外亲水,因此可以作为主体包合各种小分子^[1-5]。根据环中葡萄糖单元的分子数目不同可以分为 α -、 β -、 γ -以及更大的环状糊精^[6]。Villiers 1891 年在软化芽孢杆菌作用后的淀粉中首次发现,并在 1903 年由 Schardinger 首先分离出两种结晶体,分别命名为 α -环糊精(α -cyclodextrin)和 β -环糊精(β -cyclodextrin)。 β -环糊精由于其适宜的空腔尺寸和无毒的特性使得它更容易包合各种有机小分子尤其是对小分子药物的

包合。其作为药用辅料,主要作为包合剂和稳定剂使用,以起到提高溶出和生物利用度的作用^[7-13]。

因工艺原因, β -环糊精生产过程中会同时产生 6 个葡萄糖结合的 α -环糊精杂质和 8 个葡萄糖结合的 γ -环糊精杂质,同时淀粉酶解还可能会产生葡萄糖及麦芽糖等,这些单糖或二糖大多具有还原性,对产品尤其是制剂的相容性有影响。因此,控制 β -环糊精中的有关物质的含量具有极大的意义。

β -环糊精首次收载于《中国药典》2000 版二部,作为赋形剂使用;经《中国药典》2002 增补本修订了还原糖限度后,《中国药典》2005 版未作变动,后该品种质量标准经过较大修订和提高,收载于《中国药典》2010 版,增加了红外、杂质吸光度、残留溶剂(环己烷)、微生物限度,修订了含量测定的限度,并

将类别修订为:药用辅料,包合剂和稳定剂等。而现行的《中国药典》2015 版四部质量标准,与 2010 版二部收载标准一致,未作变动^[1]。历版及现行版标准中均未收载有关物质检查项目。而美国和欧洲等国外药典中均对有关物质进行了限制,要求 α -型和 γ -型环糊精各单个杂质含量均不得超过 0.25%^[14-15]。

国家评价性抽验是国家食品药品监督管理总局组织,对常见、常用药物的全国性综合抽查,以期对全国范围内 β -环糊精生产厂家的产品质量情况进行统计分析,本文仅对其中的有关物质进行介绍,以期通过本项研究对 2015 版《中国药典》收载的 β -环糊精品种标准进行提高,为国家食品药品监督管理局风险监控提供技术参数。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Thermo ICS-5000 离子色谱仪,LTQ Orbitrap XL SN/01475B 高分辨质谱。离子色谱柱:CarPac PA200 保护柱,50 mm $\times$ 3 mm,P/N 062895,S/N:2 465;CarPac PA 200 分析柱,250 mm $\times$ 3 mm,P/N 062896,S/N:2 384。

1.2 试剂 α -环糊精 (I1507070) 和 γ -环糊精 (I1529084) 对照品均购自 aladdin 阿拉丁试剂(上海)有限公司; β -环糊精对照品 (100317-201203) 为国家药品标准物质;GR 级别硝酸购自 Sigma 公司;水为本实验室自制去离子水,实验中所用其他试剂均为分析纯。

1.3 测试样品 抽取本次评价性抽验中的样品,涵盖不同厂家不同年度多批次的样品共 53 批,进行检测。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 取 α -环糊精和 γ -环糊精对照品适量,精密称定,加水溶解制成每 1 mL 中约含 2.5 μ g 的混合对照品溶液。取各分析样品适量,加水溶解并稀释成每 1 mL 中约含 1 mg 样品的溶液,作为供试品溶液,溶剂作为空白溶液。选取待测样品 1 批,共 9 份,每份 10 mg,精密称定,分 3 个水平,每个水平 3 份,从低到高分别加入其限度量的 80%、100% 和 120%,即加入 γ -环糊精混合对照的量分别为 20、25 和 30 μ g 3 个水平,作为回收溶液用于测定 γ -环糊精的回收率。

2.2 测定法 用 CarPac PA 200 离子柱,柱温为 30 $^{\circ}$ C,检测器为安培检测器,采用金电极为工作电极,以 Ag/AgCl 为参比电极,波形为糖四电位波形,以水-NaOH 溶液(0.25 mol $\cdot$ L⁻¹)-NaAC 溶液(0.5 mol $\cdot$ L⁻¹)为流动相,进行梯度洗脱。流速为 0.45 mL

$\cdot$ min⁻¹。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序表/%

时间/min	A	B	C
	H ₂ O	0.25 mol $\cdot$ L ⁻¹ NaOH	0.5 mol $\cdot$ L ⁻¹ NaAC
0	96	4	0
5	96	4	0
8	70	30	0
14	70	30	0
20	58	30	12
30	40	30	30
31	0	100	0
35	0	100	0
36	96	4	0
40	96	4	0

精密量取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,分别注入离子色谱仪,记录色谱图。供试品溶液色谱图中如有杂质峰, α -环糊精和 γ -环糊精峰面积不得大于对照品溶液中相应成分峰面积(0.25%)。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取 α -环糊精和 γ -环糊精对照品适量,精密称定,加水制备成 10、5、2、1 和 0.5 倍限度浓度的对照品溶液,以峰面积对各成分浓度作线性回归方程,在 0.5 ~ 10 mg $\cdot$ L⁻¹ 浓度范围内, α -环糊精和 γ -环糊精浓度和其峰面积呈良好的线性关系,其线性回归方程为; α -环糊精: $Y = 0.3255X + 0.158$ ($r = 0.993$); γ -环糊精: $Y = 0.2465X + 0.2135$ ($r = 0.991$)。

2.3.2 精密度 取限度的对照品浓度溶液,连续进样 6 次,峰面积 RSD 分别为:1.0% (α -环糊精)和 3.0% (γ -环糊精),说明系统精密度良好。

2.3.3 重复性 选取批号为 160504 的某企业样品,按上述方法配制后,重复测定 6 份,均只测得有 γ -环糊精杂质,测得值在 0.15% ~ 0.19% 范围内,表明重复性良好。

2.3.4 定量限和检出限 取制备的各杂质对照品溶液,逐步稀释,进样,以信噪比为 10 时的浓度为定量限,以信噪比为 3 左右的浓度为检测限,结果表明 α -环糊精的定量限为 0.4 mg $\cdot$ L⁻¹, γ -环糊精的定量限为 1.0 mg $\cdot$ L⁻¹; α -环糊精的检测限为 0.2 mg $\cdot$ L⁻¹, γ -环糊精的检测限为 0.5 mg $\cdot$ L⁻¹。

2.3.5 回收率 选取批号为 160504 的某企业样品(测得只含 γ -环糊精,0.17%) 9 份,按照“2.1”项下方法配制供试品溶液,测试并计算加样回收率,结果见表 2。

表2 回收率测试结果表

样品含量/ μg	加入量/ μg	测得值/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD%
17.2	19.9	37.1	99.7	100.0	2.8
18.2	19.9	37.8	98.6		
17.7	19.9	37.1	97.5		
17.0	24.9	41.4	98.1		
17.3	24.9	41.6	97.7		
17.5	24.9	41.8	97.8		
18.0	29.8	49.0	103.9		
17.2	29.8	48.1	103.4		
17.4	29.8	48.1	102.9		

2.4 样品测定结果 取本次抽验的53批样品,依上述方法测定,结果发现,53批样品均未检出 α -环糊精,全部样品均检出 γ -环糊精,其中20批样品中 γ -环糊精含量超过0.25%。

2.5 质谱确证

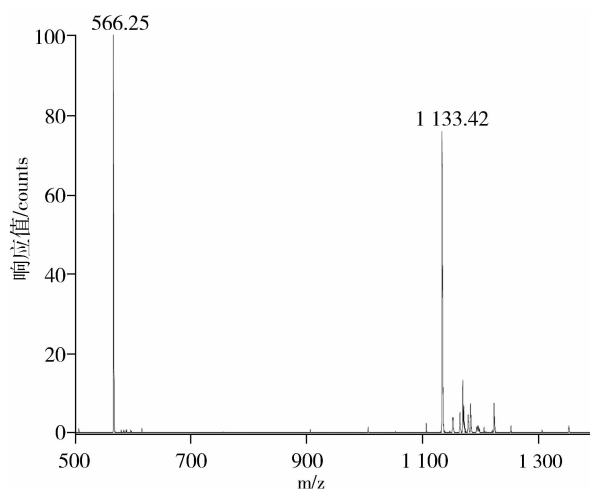
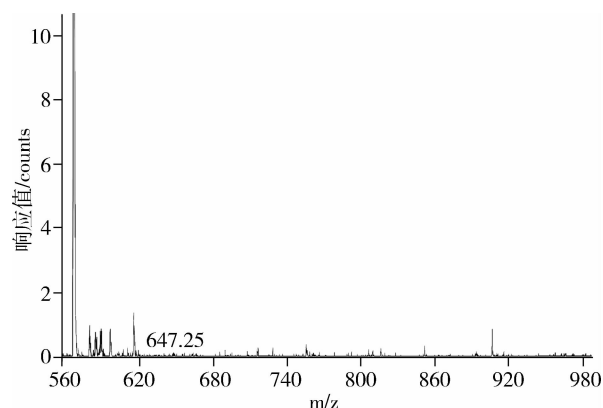
2.5.1 溶液的制备 精密称取 β -环糊精对照品10 mg,加水1 mL,超声溶解作为 β -环糊精对照溶液。精密称取 α -环糊精对照品和 γ -环糊精对照品各10 mg,置50 mL容量瓶中,加水适量,超声使溶解,加水稀释至刻度,作为 α -环糊精与 γ -环糊精混合对照溶液。精密称取 β -环糊精对照品10 mg,加上述 α -环糊精与 γ -环糊精混合对照溶液150 μL ,再加水850 μL ,超声使溶解,作为混合对照溶液。精密称取样品10 mg,加水1 mL,超声使溶解,作为供试品溶液。

2.5.2 实验参数 电离模式:ESI电喷雾电离;保护气:30 arb;辅助气:5 arb;喷雾电压:2.5 KV;毛细管温度:275 $^{\circ}\text{C}$;毛细管电压:50 V;透镜电压:100 V;离子阱扫描范围:300~1400。

α -环糊精:分子式 $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{30}$,ESI-单电荷 $m/z = 971.4$; β -环糊精:分子式 $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$,ESI-单电荷 $m/z = 1133.4$,双电荷 $m/z = 566.2$; γ -环糊精:分子式 $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{40}$,ESI-单电荷 $m/z = 1295.4$,双电荷 $m/z = 647.2$ 。

2.5.3 α -环糊精与 γ -环糊精的质谱确认 采用离子阱质谱法对批号为150805样品中检出的 γ -环糊精杂质进行质谱确认。将“2.5.1”中 β -环糊精对照溶液和供试品溶液分别进样,得到了一致的 β -环糊精质谱图。图1为样品的 β -环糊精特征离子峰图谱,可以看出在566.25和1133.42处出现了 β -环糊精的特征离子峰。图2为样品中 γ -环糊精特征离子峰图谱,在647.25处出现了特征离子峰。而在对照溶液中未出现 γ -环糊精特征离子峰。

通过上述质谱分析,确认样品中确实存在 β -环糊精,这很好的佐证了离子色谱法的测定结果。

图1 样品中 β -环糊精特征离子峰图谱图2 样品中 γ -环糊精特征离子峰图谱

3 讨论

本次国评抽验的全部样品均检出 γ -环糊精,且其中多批样品的 γ -环糊精含量超过0.25%。欧洲药典8.0版和美国药典38版都对 β -环糊精中的有关物质进行了控制,限度要求 α -环糊精和 γ -环糊精的单个杂质含量均不得超过0.25%,此次抽验样品均检出 γ -环糊精,且多批次该项目超标,表明国内生产厂家对该项目重视程度不够,生产工艺存在一定问题,建议通过多次离心及重结晶等方法以净化产品,提高产品质量。同时也迫切需要拟定相关法定标准,将有关物质进行限制。

实验通过离子色谱法对 β -环糊精中的有关物质进行检测,结果发现样品普遍含有 γ -环糊精,且多批次含量超过0.25%的限度。此外,通过质谱法对样品中含有的 γ -环糊精进行了确认,两者结果一致。提示企业应对生产工艺进行完善以控制工艺生成的 α -环糊精和 γ -环糊精。由于现行中国药典没有进行该项目的控制,建议尽快对现有标准进行修订。