

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.020

甘露醇原料药及其制剂中甘露醇的高效液相色谱 - 电喷雾检测器分析方法*

赵 慧,王董云,吴 珺

(江苏省泰州市药品检验院,江苏 泰州 225300)

摘要:目的 建立甘露醇原料药及其制剂中甘露醇的高效液相色谱-电喷雾检测器(HPLC-CAD)分析方法。方法 色谱柱为Waters XBridge Amide 柱(250 mm×4.6 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈-水(70:30, V/V),流速为1.0 mL/min,柱温为35℃,进样量为10 μL;雾化温度为55℃,幂率为1.0,采样频率为10 Hz,过滤常数为3.6 s。结果 甘露醇质量浓度在10~200 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9978$, $n=5$);平均回收率为99.96%, RSD 为1.24%($n=9$);定量限为1.0 μg/mL,检测限为0.2 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于2.0%。3批甘露醇原料药中甘露醇的含量测定结果分别为99.21%,99.43%,99.32%, RSD 均小于1.0%($n=4$);有关物质总杂质含量分别为0.25%,0.21%,0.23%。3批注射用胸腺五肽中甘露醇的含量测定结果分别为0.94,0.93,0.91 mg/mg, RSD 均小于1.50%($n=4$)。结论 该方法简便、快速、灵敏、准确,可用于甘露醇原料药及其制剂中甘露醇的含量测定及质量控制。

关键词:高效液相色谱法;电喷雾检测器;甘露醇;注射用胸腺五肽;含量测定;有关物质;质量控制

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)11-0079-04

Determination of Mannitol in Mannitol API and Its Preparation by HPLC-CAD

ZHAO Hui, WANG Dongyun, WU Jun

(Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou, Jiangsu, China 225300)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-charged aerosol detection (HPLC-CAD) method for the determination of mannitol in mannitol active pharmaceutical ingredients (API) and its preparation. **Methods** The chromatographic column was Waters XBridge Amide column (250 mm×4.6 mm, 3.5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (70:30, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃ and the injection volume was 10 μL. The detector of CAD was applied with nebulization temperature at 55℃, power function value (PFV) at 1.0, collection frequency at 10 Hz and filter constant at 3.6 s. **Results** The linear range of mannitol was 10-200 μg/mL ($r=0.9978$, $n=5$). The average recovery of mannitol was 99.96% with an RSD of 1.24% ($n=9$). The limit of quantification (LOQ) was 1.0 μg/mL and the limit of detection (LOD) was 0.2 μg/mL. The RSD s of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The contents of mannitol in the three batches of mannitol API were 99.21%, 99.43% and 99.32% with RSD s less than 1.0% ($n=4$), respectively, and the total impurity contents of related substances in the above three batches of mannitol API were 0.25%, 0.21% and 0.23%, respectively. The contents of mannitol in the three batches of Thymopentin for Injection were 0.94, 0.93 and 0.91 mg/mg with RSD s less than 1.50% ($n=4$), respectively. **Conclusion** The method was simple, rapid, sensitive and accurate, which can be used for the determination and quality control of mannitol in mannitol API and its preparation.

Key words: HPLC; CAD; mannitol; Thymopentin for Injection; content determination; related substance; quality control

甘露醇(D -甘露糖醇)为良好的脱水利尿药,临床常用于降眼压、降颅内压等,也常用于治疗急性肾功能衰竭的尿闭症。甘露醇也为常用药用辅料,可用作药物制剂的赋形剂,固体、液体的稀释剂,以及冻干粉针剂的载体^[1]。2020年版《中国药典(二部)》中采用高效液相色谱(HPLC)法测定其有关物质,但灵敏度低、柱温高、适用性差等;采用容量分析法测定甘露醇含量,操作烦琐,专属性差^[2]。目前,甘露醇及其制剂中甘露醇的研究方法主要有HPLC法、离子色谱法、旋光法、紫外-可见分光光度法等^[3-5],其中应用较广的是HPLC法,大多采用蒸发光散射检测器(ELSD)或示差检测器

(RID)进行测定^[6-7]。ELSD大多采用氨基柱,存在柱效下降快、灵敏度低等问题;RID大多采用离子交换柱,存在柱温高、适用性差、基线波动大等问题。电喷雾检测器(CAD)是一种新型通用检测器,具有灵敏度高、重复性好等优势,且检测信号响应不依赖于被测物的化学结构,适用于不挥发性或半挥发性物质的检测,被广泛应用于皂苷类、糖类、生物碱类、脂类化合物等无紫外吸收或弱紫外吸收组分的测定^[8]。本研究中采用HPLC-CAD法对甘露醇原料药及其制剂中的甘露醇进行分析,具有简便、快速、灵敏、准确等优势。现报道如下。

*基金项目:江苏省泰州市科技支撑计划(社会发展)项目[TS201910]。

第一作者:赵慧,女,硕士,主管药师,研究方向为药品检验和药品质量控制,(电子信箱)yaoxuezh@yeah.net。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),配有 UltiMate 3000 型四元泵、UltiMate 3000 型自动进样器、Corona Veo RS 型电喷雾检测器、Chromeleon™ 色谱工作站;KH-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 400 W,频率为 40 kHz);Mettler XSE205DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

甘露醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100533-201304,含量为 99.0%);乙腈(色谱纯,西班牙 Scharlau 公司);盐酸、氢氧化钠、30% 过氧化氢(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);试验用水均由 Milli-Q 纯水系统制备;甘露醇原料药 3 批;注射用胸腺五肽为胸腺五肽加适量甘露醇经冷冻、干燥制成的无菌冻干品,共 3 批,拟采用注射用胸腺五肽进行制剂中甘露醇的测定。各样品批号和来源见表 1。

表 1 样品批号和来源

Tab. 1 Batch numbers and sources of samples

样品	批号	来源
甘露醇	FL2005003	法国罗盖特公司
	E790G	法国罗盖特公司
	361512014	青岛明月海藻集团有限公司
注射用胸腺五肽	19082321	扬子江药业集团有限公司
	19042721	扬子江药业集团有限公司
	18092521	扬子江药业集团有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

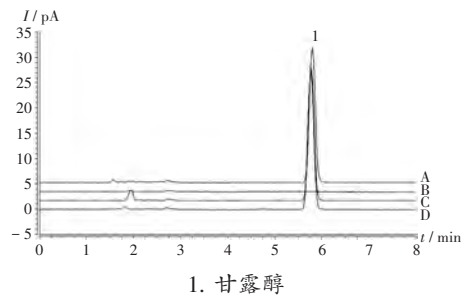
色谱柱:Waters XBridge Amide 柱(250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm);流动相:乙腈-水(70:30, V/V);流速:1 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μL;电喷雾检测器参数:雾化温度为 55 ℃,雾率为 1.0,采样频率为 10 Hz,过滤常数为 3.6 s。

2.2 溶液制备

取甘露醇对照品 10 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为对照品溶液。取甘露醇样品 10 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为甘露醇供试品溶液。取注射用胸腺五肽内容物适量,精密称定,加水适量,超声使溶解,用水稀释成每 1 mL 约含 0.1 mg 甘露醇的注射用胸腺五肽供试品溶液。取甘露醇样品约 50 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为有关物质测定用供试品溶液;精密量取 1 mL,置 100 mL 容量瓶中,用水稀释并定容,摇匀,作为有关物质测定用对照品溶液。以水作为空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取空白溶液,2.2 项下甘露醇对照品溶液、甘露醇供试品溶液及注射用胸腺五肽供试品溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,色谱图见图 1。结果表明,空白溶剂对主峰无干扰,样品中杂质对测定无干扰,甘露醇色谱峰理论板数大于 5 000,拖尾因子小于 1.2。



1. 甘露醇
A. 注射用胸腺五肽供试品溶液 B. 空白溶液
C. 甘露醇供试品溶液 D. 甘露醇对照品溶液

图 1 专属性试验高效液相色谱图

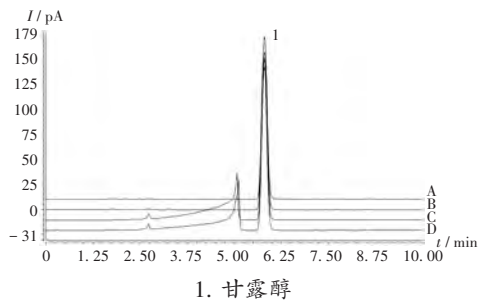
1. Mannitol

A. Test solution of Thymopentin for Injection B. Blank solution
C. Test solution of mannitol D. Reference solution of mannitol

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

破坏性试验:取甘露醇对照品 10 mg,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,加水适量使溶解,分别进行以下破坏性试验。1) 碱破坏。加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,室温放置 4 h,加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL,用水稀释至刻度,摇匀。2) 酸破坏。加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL,室温放置 4 h,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,用水稀释至刻度,摇匀。3) 氧化破坏。加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL,室温放置 4 h,用水稀释至刻度,摇匀。4) 高温破坏。水浴加热 4 h,放冷至室温,用水稀释至刻度,摇匀。精密量取上述破坏后的试验溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,色谱图见图 2。结果各破坏性试验产生的杂质峰均能与甘露醇主峰达到有效分离,对测定无干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:取甘露醇对照品 20 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液;精密量取适量,用水分别稀释成质量浓度为 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL 的系列对照品溶液。精密量取上述溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定。以甘露醇的峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.9675X + 25.4870$ ($r = 0.9978, n = 5$)。结果表明,甘露醇质量浓度在 10~200 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



A. 高温破坏 B. 氧化破坏 C. 碱破坏 D. 酸破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Mannitol

A. High-temperature damage B. Oxidative damage C. Alkali damage
D. Acid damage

Fig. 2 HPLC chromatograms of damage tests

定量限和检测限确定:取甘露醇对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释成系列质量浓度的溶液,并进样测定,以信噪比(S/N)为3时的质量浓度为检测限,以 S/N 为10时的质量浓度为定量限。结果检测限为 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$,定量限为 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

精密度试验:精密吸取质量浓度为 0.1 mg/mL 的甘露醇对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定。结果甘露醇色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.07% 和 0.24% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取甘露醇原料药(批号为FL2005003)及注射用胸腺五肽(批号为19042721)各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算。结果甘露醇及注射用胸腺五肽中甘露醇含量分别为 99.21% 和 0.93 mg/mg , RSD 分别为 0.34% 和 0.54% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2项下甘露醇供试品溶液适量,分别于0,4,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果甘露醇色谱峰峰面积的 RSD 为 1.20% ($n=4$),表明甘露醇供试品溶液在常温下12 h内稳定。

耐用性试验:通过调节流动相比、流速及柱温,考察甘露醇主峰的拖尾因子及与相邻杂质峰的分离情况。结果甘露醇峰的拖尾因子均小于1.2,杂质对主峰无干扰,表明方法耐用性良好。

加样回收试验:取已知甘露醇含量的注射用胸腺五肽(批号为19042721)9份,精密称定,每组3份,分别按比例精密加入相当于甘露醇含量80%,100%,120%的甘露醇对照品,加水溶解,分别制成高、中、低3个浓度的供试品溶液,平行3次。按2.1项下色谱条件各进样测定,计算加样回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

分别取甘露醇原料药(批号分别为FL2005003, E790G, 361512014),注射用胸腺五肽(批号分别为

表2 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
10.21	8.09	18.16	98.27		
10.56	8.11	18.66	99.88		
10.55	8.26	18.86	100.61		
10.64	10.09	20.78	100.50		
10.05	10.56	20.56	99.53	99.96	1.24
10.18	10.41	20.73	101.34		
10.33	12.09	22.17	97.93		
10.52	12.25	22.77	100.00		
10.23	12.36	22.78	101.54		

19082321, 19042721, 18092521)和甘露醇对照品(批号为100533-201304)各适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液与对照品溶液,平行2份,每份按2.1项下色谱条件进样测定2次,记录峰面积,按外标法计算含量。结果见表3。

表3 甘露醇含量测定结果($n=4$)

Tab. 3 Results of content determination of mannitol ($n=4$)

样品	批号	含量(%)	RSD (%)	样品	批号	含量(mg/mg)	RSD (%)
甘露醇原	FL2005003	99.21	0.34	注射用胸腺	19082321	0.94	0.86
料药	E790G	99.43	0.95	五肽	19042721	0.93	0.54
	361512014	99.32	0.63		18092521	0.91	1.01

2.5 有关物质测定

取甘露醇原料药(批号分别为FL2005003, E790G, 361512014)适量,依法制备有关物质测定用供试品溶液和对照品溶液,分别注入液相色谱仪,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图至甘露醇主峰保留时间的3倍,按自身对照法计算杂质的含量。结果见表4。

表4 甘露醇原料药中有关物质测定结果(%)

Tab. 4 Results of determination of related substances in mannitol API (%)

批号	单个最大杂质	杂质总量
FL2005003	0.07	0.25
E790G	0.04	0.21
361512014	0.06	0.23

3 讨论

3.1 色谱条件选择

常采用氨基柱或强阳离子交换柱对甘露醇进行检测,但氨基柱柱效下降快,强阳离子交换柱使用柱温高、适用性差。本研究中采用XBridge Amide色谱柱,该色谱柱采用了化学稳定、三键键合式的酰胺官能团,为杂化硅胶基质的新型亲水色谱柱,适合分析极性化合物,且稳定性更高,使用寿命更长^[9-11]。本研究中分别考察了不同流动相比对测定结果的影响,结果随着水相比的增加,甘露醇色谱峰的保留时间不断缩短,