

# 超高效液相色谱法测定利拉鲁肽原料药的含量

章文星\*, 姜洪涛\*, 周春萍, 王传跃

(浙江工业大学 化学工程与材料学院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:**建立了快速、准确、灵敏的测定利拉鲁肽原料药的方法。采用 Waters ACQUITY Ultra Performance LC 系统 (UPLC), Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), 以乙腈-10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 为流动相梯度洗脱, 流速为 0.21 mL/min, 柱温为 35℃, 检测波长为 215 nm。结果表明:该方法高效、快速、灵敏,能很好地测量利拉鲁肽原料药含量。

**关键词:**超高效液相色谱; 高效液相色谱; 利拉鲁肽

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)05-0182-03

## Determination of liraglutide by UPLC

ZHANG Wen-xing\*, JIANG Hong-tao\*, ZHOU Chun-ping, WANG Chuan-yue

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** Ultra performance liquid chromatography (UPLC) is used to determine the liraglutide active pharmaceutical ingredient in this study. The operation parameters are shown as follows: Waters ACQUITY UPLC system, Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), acetonitrile-NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as mobile phase, 0.21 mL/min of flow rate, 35℃ of column temperature, 215 nm of detector wavelength. This rapid, accurate method with high sensitivity provides a good choice for determination of liraglutide.

**Key words:** UPLC; HPLC; liraglutide

利拉鲁肽 (Liraglutide) 是由诺和诺德公司研发的 GLP-1 类似物, 该药物于 2010 年 1 月 25 日在美国批准上市, 剂型是皮下注射, 每日只需皮下注射 1 次即可发挥良好的降糖作用<sup>[1]</sup>。利拉鲁肽可以降低糖尿病患者体重, 改善 β 细胞功能, 对治疗 2 型糖尿病患者有着良好的效果, 市场前景广阔<sup>[2-3]</sup>。

超高效液相色谱法 (UPLC) 是一个逐渐被关注的新领域, 2004 年 3 月, 美国 Waters 公司开发了第 1 台超高效液相色谱系统。与传统的液相色谱 (HPLC) 相比, 其填料颗粒小、均匀, 具有高柱效, 分析速度快, 分离度高, 灵敏度好等特点, 因此被广泛应用在生物化学、药物研究分析等领域<sup>[4-7]</sup>。笔者采用 UPLC 方法进行利拉鲁肽原料药含量的测定, 为提升利拉鲁肽缓释原料药的质量标准提供方法依据以及其缓释微球含量的测定提供了参照。

## 1 仪器和试剂

美国 Waters ACQUITY Ultra Performance LC 系统, Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), Phenomenex Jupiter Proteo 90A New colum (250 mm × 4.6 mm, 4 μm)。利拉鲁肽原料药 (深圳健元医药科技有限公司生产, 批号: 140701); 乙腈, 色谱纯; 其他药品为分析纯, 水为超

纯水; 供试品溶液配制: 称取利拉鲁肽样品 5 mg, 加入 10 mL 容量瓶中, 加水定容至 10 mL, 摇匀作为贮备液。

## 2 实验方法

UPLC 法色谱条件: Waters ACQUITY 超高相液相色谱法系统, 配置 ACQUITY PDA 检测器; 色谱柱: Acquity UPLC BEH, C<sub>18</sub> (1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm); 流动相 A: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10% 乙腈, 用 80% 磷酸调节 pH 至 3.8; 流动相 B: 78% 乙腈; 检测波长为 215 nm, 柱温为 35℃, 流速为 0.21 mL/min, 进样量为 10 μL。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	w(流动相 A)/%	w(流动相 B)/%
0.0	0.21	50	50
4.4	0.21	50	50
5.8	0.21	10	90
6.4	0.21	50	50
10	0.21	50	50

## 3 结果

### 3.1 线性范围考察

取利拉鲁肽原料药 20.003 mg (精密称定, 质量

分数为 99.2%) 置于 20 mL 容量瓶中,用 PBS(pH 为 7.4) 溶解,摇匀。依次稀释,分别制成浓度为 0.5、0.25、0.1、0.05、0.025 mg/mL 的对照品溶液。在上述超高效液相色谱法色谱条件下进行测定,考察线性关系,如图 1 所示。结果显示,UPLC 的回归方程为  $y = 41\,548\,450x + 28\,783$ ,相关系数为  $R^2 = 0.999\,3$ ,线性良好。

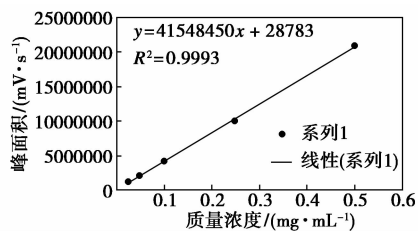


图 1 标准曲线测定结果

### 3.2 精密度试验

取利拉鲁肽原料药 10.012 mg(精密称定,质量分数为 99.2%),置于 100 mL 容量瓶中,加 PBS(pH 为 7.4) 溶液至刻度,摇匀。制成质量浓度为 0.100 12 mg/mL 利拉鲁肽原料药溶液。在上述 UPLC 超高效液相色谱法色谱条件下,1 d 内连续测定 6 次,结果如表 2 所示。结果显示,利拉鲁肽的峰面积的  $RSD$  为 0.7%,系统精密度良好。

表 2 系统精密度考察结果( $n=6$ )

编号	峰面积	平均峰面积	$RSD/\%$
1	4129386	4160056	0.7
2	4190908		
3	4128469		
4	4170819		
5	4146097		
6	4194659		

### 3.3 供试品稳定性试验

取利拉鲁肽原料药样品 10.365 mg(精密称定,质量分数为 99.2%),置于 100 mL 容量瓶中,加 PBS(pH 7.4) 溶液稀释至刻度,摇匀。制成质量浓度为 0.103 65 mg/mL 利拉鲁肽原料药溶液。在上

表 3 稳定性实验结果( $n=6$ )

编号	时间/h	峰面积	平均峰面积	$RSD/\%$
1	0	4338693	4355108	0.4
2	4	4352820		
3	8	4333234		
4	12	4373749		
5	24	4364995		
6	48	4367157		

述超高效液相色谱法色谱条件下,在 0、4、8、12、24、48 h 时进行测定,以利拉鲁肽的峰面积进行考察,进样 6 次,测得  $RSD$  为 0.38%。结果表明,至少在 48 h 内稳定。结果如表 3 所示。

### 3.4 重复性试验

分别精密称取利拉鲁肽原料药样品 6 份(10.023、10.056、10.087、10.095、10.074、10.019 mg),分别加入 100 mL 容量瓶中,用 PBS(pH 为 7.4) 溶液稀释至刻度,摇匀得到利拉鲁肽原料药溶液的质量浓度分别为 0.1002 3、0.100 56、0.100 87、0.100 95、0.100 74、0.100 19 mg/mL,将不同质量浓度的样品过滤后,在上述 UPLC 的色谱条件下进行测定。计算得利拉鲁肽的平均质量分数为 99.1%, $RSD$  为 0.2%,重现性良好。结果如表 4 所示。

表 4 重复性实验结果( $n=6$ )

编号	质量分数/%	平均质量分数	$RSD/\%$
1	99.20	99.1	0.2
2	99.18		
3	99.09		
4	99.20		
5	98.83		
6	99.17		

### 3.5 加样回收试验

取利拉鲁肽原料药样品 3 组,每组 3 份。第 1 组: 8.061、8.133、8.121 mg; 第 2 组: 11.017、12.032、12.098 mg; 第 3 组: 15.042、16.053、15.927 mg。分别置于 200 mL 容量瓶,定容至刻度,摇匀。在上述色谱条件下进行测定,得出超高效液相色谱法平均回收率为 99.5%, $RSD$  为 1.3%。准确度良好。

### 3.6 样品测定

#### 3.6.1 UPLC 方法测定样品

称取 3 批利拉鲁肽原料药,分别为 10.016、10.008、10.031 mg。溶于 100 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,制备成利拉鲁肽原料药溶液。用上述超

表 5 UPLC 法测定利拉鲁肽原料药的质量分数

样品批号	峰面积	质量分数/%	平均质量分数/%	$RSD/\%$
140701	4112742	99.19	99.1	0.2
	4163094	99.18		
140702	4170823	99.13		
	4190904	99.15		
140703	4170832	98.73		
	4139619	99.16		

高效液相色谱法,每个批次进样 2 针,根据色谱图的积分结果得出生长抑素的质量分数,结果如表 5 所示。

### 3.6.2 HPLC 方法测定样品

取上述 3 个批次的利拉鲁肽原料药,按照上述方法都配成质量浓度为 0.5 mg/mL 的样品,用 HPLC 方法进行测定,HPLC 色谱条件:HPLC: Waters 2795 配置 Waters 2489 UV/visible Detector,色谱柱: Phenomenex Jupiter Proteo 90A New column(250 mm × 4.6 mm, 4 μm)。流动相 A: 10 mmol/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 10% 乙腈,用 80% 磷酸调节 pH 至 3.8;流动相 B: 78% 乙腈,检测波长为 215 nm,柱温为 35℃,流速为 1 mL/min,进样量为 30 μL。梯度洗脱条件如表 6 所示。

表 6 梯度洗脱条件

t/min	流速/(mL·min <sup>-1</sup> )	w(流动相 A)/%	w(流动相 B)/%
0	1	50	50
35	1	50	50
45	1	10	90
48	1	50	50
55	1	50	50

利拉鲁肽的 HPLC 色谱测定结果分别如图 2、表 7 所示。

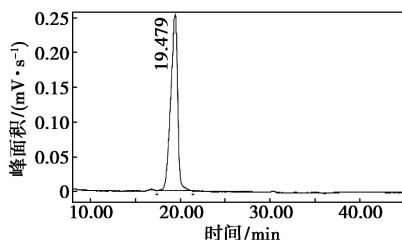


图 2 利拉鲁肽的 HPLC 色谱图

表 7 HPLC 法测定生长抑素原料药的质量分数

样品批号	峰面积	质量分数/%	平均质量分数/%	RSD/%
140701	13654102	99.19	99.0	0.4
	13713304	99.20		
140702	13546578	99.13	99.0	0.4
	13539619	99.06		
140703	13637862	98.38	99.0	0.4
	13580475	99.16		

利用 2 种不同的方法对利拉鲁肽原料药的质量分数进行测定。HPLC 方法测定的原料药中利拉鲁肽的质量分数为 99.0%, RSD 为 0.4%; UPLC 方法

测得的原料药中利拉鲁肽的质量分数为 99.1%, RSD 为 0.2%, 2 种方法测出的结果很相近, RSD 为 0.2%, 样品测定重复性好。

## 4 结论

(1) 采用超高效液相色谱技术检测利拉鲁肽原料药含量,该方法的线性范围为 0.025 ~ 0.5 mg/mL ( $R^2 = 0.9993$ ),在系统精密度实验中,利拉鲁肽峰面积的 RSD 为 0.7%,系统精密度良好;稳定性试验中测得 RSD 为 0.5%,表明样品在 48 h 内的稳定性良好;平均回收率为 99.1%, RSD 为 0.8%,系统的准确度良好;在回收率试验中,平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.3%,表明系统的准确度良好;样品测定重复性 RSD 为 0.2%,重复性较好。原料药中,利拉鲁肽的平均质量分数为 99.1%。

(2) 建立了 ACQUITY UPLC-PDA 系统检测利拉鲁肽原料药的方法,该方法的出峰时间仅为 4 min,与 HPLC 19 min 的出峰时间相比,时间减少了 79%,能够快速的检测利拉鲁肽原料药的质量分数。HPLC 方法虽也能很好的分离样品,但 UPLC 方法相比 HPLC 方法却有着更一步提高,分离度好,灵敏度高,速度快。

## 参考文献

- [1] Nathan D M, Buse J B, Davidson M B, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(1): 193-203.
- [2] Holst J. The physiology of glucagon-like peptide-1 [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1409-1439.
- [3] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.
- [4] 周新, 陈会明, 白桦, 等. HPLC 与 UPLC 色谱条件转换方法研究 [J]. *分析实验室*, 2008, 27(4): 56-58.
- [5] Want E J, Wilson I D, Gika H, et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(6): 1005-1018.
- [6] XU Ying-jiang, GONG Xiang hong, ZHANG Xiu-zhen, et al. I. Determination of Melamine in Seawater and Sediments by UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2009, 30(2): 71-73.
- [7] Sterz K, Scherer G, Ecker J. A simple and robust UPLC-SRM/MS method to quantify urinary eicosanoids [J]. *Journal of Lipid Research*, 2012: jlr. D023739. ■