

超高效液相色谱法测定艾塞那肽含量

周春萍^{1*}, 王传跃^{1,2}, 章文星¹

(1. 浙江工业大学化学工程学院, 浙江 杭州 310032;

2. 浙江工业大学之江学院, 浙江 绍兴 312030)

摘要:建立了艾塞那肽含量的 UPLC 测定方法。采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), 检测波长为 214 nm, 梯度洗脱, 流动相 A: 0.1 mol/L 的四乙基高氯酸铵溶液; 流动相 B: 100% 乙腈溶液; 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 1.4 μL, 柱温为 50℃。结果表明, 艾塞那肽质量浓度在 0.04 ~ 0.4 mg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 100.1%; 稳定性实验表明, 室温下艾塞那肽溶液 8 h 内能稳定存在。艾塞那肽质量分数平均在 98% 以上, 满足纯度要求。该检测方法能够快速简便地测定艾塞那肽质量分数, 且成本较低, 精度较高, 适用于艾塞那肽的质量控制。

关键词:艾塞那肽; 超高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2015)07-0164-03

Determination of exenatide in exenatide by ultra-performance liquid chromatography

ZHOU Chun-ping^{1*}, WANG Chuan-yue^{1,2}, ZHANG Wen-xing¹

(1. College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China;

2. Zhijiang College of Zhejiang University of Technology, Shaoxing 312030, China)

Abstract: A UPLC method is established for the determination of exenatide. The experiment is performed with an Acquity BEH C₁₈ (1.7 μm, 2.1 × 50 mm) column and the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% tetraethylammonium perchlorate with gradient elution. The flow rate of 0.2 mL/min and the injection volume of 1.4 μL as well as the column temperature of 40℃ are employed. The result shows that the calibration curve for exenatide is linear within the range of 0.04 - 0.4 mg/mL. The average recovery is 100.1%. Stability tests show that the exenatide is stable within 8 hours at room temperature. The average determination of exenatide is above 98%. The method is proved to be rapid and accurate and can be used for the quality control of exenatide.

Key words: exenatide; UPLC; content determination

艾塞那肽是美洲希拉巨蜥唾液分泌物胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的类似物, 与 GLP-1 有 53% 的序列同源性^[1]。不但具有类 GLP-1 促胰岛素分泌的功能, 而且其体内稳定性也远高于 GLP-1^[1-3]。

刘玉雪等^[3]采用 C₁₈ 色谱柱, 乙腈-磷酸二氢为流动相体系, 用三乙胺调节 pH, 进行梯度洗脱, 用高效液相色谱 (RP-HPLC) 测定了艾塞那肽含量; Jiming Xuan^[4]、石琳等^[5]采用 C₃ 色谱柱, 乙腈-硫酸二氢钾为流动相体系, 用磷酸调节 pH, 梯度洗脱, 测定了醋酸艾塞那肽的含量; Kun Li 等^[6]采用 C₄ 色谱柱, 95% 乙腈溶液、pH 为 2.0 的磷酸缓冲溶液为流动相, 梯度洗脱, 测定艾塞那肽含量; Rongcai Liang 等^[7]采用 C₁₈ 色谱柱, 乙腈-三氟乙酸为流动相, 测定了艾塞那肽微球中艾塞那肽含量。笔者首次采用 C₁₈ 柱, TEAP-乙腈为流动相体系, 梯度洗脱, 利用超高效液相色谱 (UPLC) 进行了艾塞那肽含量的测定, 与传统的 HPLC 法相比, 该方法不仅提高了

分析效率和实验精密度, 还节约了昂贵的 TEAP 流动相。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm), Milli-Qdirect8 超纯水系统。艾塞那肽供试品, 购自海南双成药业有限公司; 四乙基高氯酸铵 (TEAP), 购自国药试剂有限公司; 其余试剂均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH, C₁₈, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm; 流动相 A: 0.1 mol/L 四乙基高氯酸铵溶液, pH = 2.05; 流动相 B: 100% 乙腈; 检测波长: 214 nm; 流速: 0.2 mL/min; 进样体积 1.4 μL; 柱温: (50 ± 2)℃; 采用梯度洗脱, 洗脱程序如表 1 所示。

表1 洗脱梯度

时间/min	流速/ (mL·min ⁻¹)	流动相 A 的 质量分数/%	流动相 B 的 质量分数/%
0.0	0.2	72.0	28.0
15.0	0.2	32.0	68.0
15.1	0.2	20.0	80.0
16.7	0.2	30.0	70.0
16.8	0.2	72.0	28.0
18.4	0.2	72.0	28.0

2.2 系统适应性实验

以超纯水为空白供试溶液,分别取空白溶液、艾塞那肽供试溶液一定量,在2.1所述的色谱条件下进样分析,结果如图1所示。由图1可知,艾塞那肽主峰的保留时间约为7 min,液相色谱柱的理论塔板数不低于2 000,拖尾因子小于2。

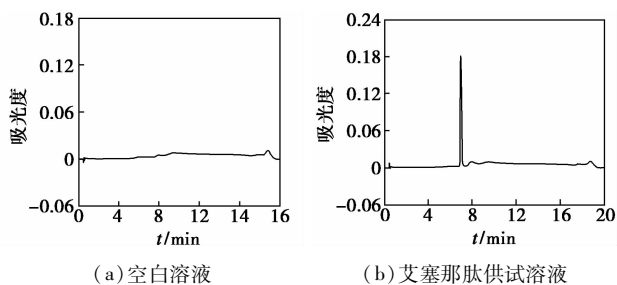


图1 色谱条件下进样分析色谱图

2.3 线性关系考察

准确称取艾塞那肽对照品16 mg,置于50 mL容量瓶中,加超纯水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得0.4 mg/mL的艾塞那肽对照品储备液。

准确移取0.4 mg/mL的艾塞那肽对照品储备液1、3、5、8、10 mL,分别置于10 mL容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为0.04、0.12、0.2、0.32、0.4 mg/mL的艾塞那肽溶液。上述样品分别注入液相色谱进行分析,进样量均为1.4 μL,重复进样2次,以质量浓度(X)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得艾塞那肽的回归方程为 $Y = 16.03 \times 10^6 X - 1.21 \times 10^3$ ($r = 0.999, n = 6$)。结果表明,艾塞那肽质量浓度在0.04~0.4 mg/mL内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 专属性实验

酸破坏供试液:精密称取艾塞那肽2.5 mg,置于10 mL容量瓶中,加入1 mol/L盐酸溶液0.1 mL,室温下放置24 h。加入适量纯水溶解,并用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,最后用纯水稀释至刻度,摇匀,作为酸破坏的供试溶液。

碱破坏供试液:精密称取艾塞那肽2.5 mg,置

于10 mL容量瓶中,加入1 mol/L氢氧化钠溶液0.1 mL,放置1 h,加适量纯水超声溶解,用1 mol/L盐酸溶液调节pH为中性,再用纯水稀释至刻度,摇匀,作为碱破坏的供试溶液。

氧化破坏供试液:精密称取艾塞那肽2.5 mg,置于10 mL容量瓶中,加入3%的双氧水溶液0.1 mL,放置30 min,用纯水超声溶解,稀释至刻度,摇匀,定容。

热破坏供试液:精密称取艾塞那肽2.5 mg,置于10 mL容量瓶中,用适量纯水超声溶解,水浴加热30 min,放冷后稀释至刻度,定容,摇匀,作为供试品溶液。

光照破坏供试液:精密称取2.5 mg艾塞那肽,加入10 mL容量瓶中,加少量纯水溶解,于4 000 Lx强光下放置24 h,再用纯水稀释至刻度,定容,作为供试溶液。

分别取上述经破坏的溶液和艾塞那肽对照品溶液一定量,按2.1所述的色谱方法进样分析,结果如图2所示。结果表明,艾塞那肽在碱性及氧化条件下极不稳定,易降解;在高温条件下稳定性较差;在酸性及光照条件下稳定性相对较好,主峰与杂质峰分离效果较好。

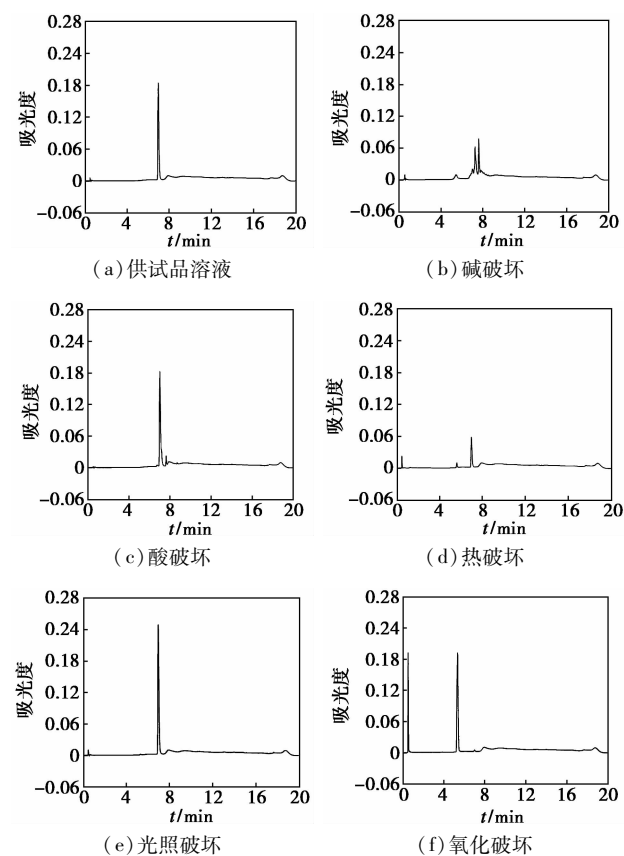


图2 UPLC 专属性实验图谱

2.5 精密度实验

准确称取艾塞那肽对照品适量,以超纯水溶解,配制成质量浓度为 0.25 mg/mL 的溶液,于超高效液相色谱中重复进样 5 次进行分析,结果如表 2 所示。结果表明,艾塞那肽峰面积的 RSD 为 0.52%,超高效液相色谱仪器精密度良好,可信度高,符合分析要求。

表 2 精密度实验结果 ($n=6$)

编号	峰面积	平均峰面积	$RSD/\%$
1	4001290		
2	3999312		
3	3989963	3986463	0.52
4	3990930		
5	3950821		

2.6 重复性实验

取同一批号的艾塞那肽注射液,平行制备 6 份供试溶液,在 2.1 所述的色谱条件下进行分析。另外,精密称取适量艾塞那肽对照品,同样按 2.1 所述的色谱条件进样分析。按外标法计算供试品的 $RSD=0.74\%$,表明此色谱分析方法的重复性较好。

2.7 回收率实验

在 9 份空白辅料中,分别精密称取艾塞那肽对照品,加入量分别为标示量的 80%、100%、120%,用超纯水溶解,配制成中、高、低 3 种质量浓度的溶液,每个质量浓度平行制备 3 份,按 2.1 所述的色谱条件进行分析,结果如表 3 所示。

表 3 艾塞那肽回收率实验

添加量/mg	回收量/mg	回收率/%	$RSD/\%$
1.6	1.603	100.2	
1.6	1.596	99.8	
1.6	1.611	100.7	
2.0	2.013	100.6	
2.0	2.002	100.1	0.34
2.0	1.996	99.8	
2.64	2.637	99.9	
2.64	2.645	100.1	
2.64	2.635	99.8	

2.8 稳定性考察

表 4 稳定性实验结果

编号	时间	峰面积	平均峰面积	$RSD/\%$
1	0	3180821		
2	1	3179583		
3	2	3177218		
4	3	3166743	3169430	0.3
5	4	3163104		
6	6	3158598		
7	8	3159941		

取适量样品配制成 0.2 mg/mL 的供试品溶液,室温下于 0、1、2、3、4、6、8 h 分别取样并进行液相色谱分析,结果如表 4 所示。结果表明,峰面积的 $RSD=0.3\%$,说明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.9 供试品质量分数测定

取一定量样品 3 份,加入纯水溶解,混匀,作为供试品溶液;另精密称取艾塞那肽对照品适量,采用同样的方法制成 0.2 mg/mL 的艾塞那肽溶液作为对照品溶液。按 2.1 所述的方法进样分析,按外标法以峰面积计算质量分数,结果如表 5 所示。3 个样品的艾塞那肽质量分数分别为 99.2%、98.9%、99.7%,满足纯度要求。

表 5 UPLC 法测定艾塞那肽原料药的质量分数

样品编号	峰面积	质量分数/%	平均质量分数/%	$RSD/\%$
1	3178821	99.19		
	3179783	99.22		
2	3164073	98.73	99.3	0.37
	3177218	99.14		
3	3189401	99.52		
	3198698	99.81		

3 结论

取适量样品,制成 0.2 mg/mL 的溶液,在 190 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描测定,发现艾塞那肽在 195 nm 处有最大吸收,考虑到末端吸收的干扰问题、基线的平稳性以及多肽的检测波长一般在 215 nm 左右,选择在 214 nm 处测定艾塞那肽含量。

在流动相选择过程中发现,采用 0.1% 的三氟乙酸-100% 乙腈作为流动相时,主峰前后出现许多无法分离的杂质峰,且基线噪音较大;而采用四乙基高氯酸铵作为流动相时,主峰与杂质峰得到了很好分离,且基线平稳。这是因为 TEAP 为离子对型溶剂,能够达到离子交换的效果,对主峰与杂质峰的分离起到促进作用。

在梯度选择的过程中发现,在开始的 15 min 内,乙腈质量分数由 28% 增加到 38%,在这一时间段内出现的主峰保留时间过长,为继续缩短保留时间,考虑在 15 min 内提高乙腈质量分数,由原来的 38% 提升为 68%,保留时间明显减小,减小到 7 min,这不仅改善了主成分的保留行为,也节约了较为昂贵的 TEAP 流动相。

实验结果显示,采用超高效液相色谱法检测

(下转第 168 页)

公司生产);AUX320 型电子分析天平(日本岛津公司生产);pHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司生产)。

金霉素(CAS:57-62-5,阿拉丁试剂公司生产)、碲粉、氯化镉、硼氢化钠、巯基乙酸均为分析纯;实验用水为二次蒸馏水;Mcllvaine-Na₂EDTA 溶液,以 0.1 mol/L 柠檬酸溶液、0.2 mol/L 磷酸氢二钠及乙二胺四乙酸二钠配制;鸡肉样品,购自当地农贸市场。

1.2 水溶性 CdTe 量子点的合成

参照文献[14]合成巯基乙酸修饰的 CdTe 量子点。准确称取 0.086 g 碲粉与 0.160 g 硼氢化钠于反应瓶中,加入 5 mL 蒸馏水溶解,冰浴中反应 8 h 得到淡紫色 NaHTe 溶液。称取 0.285 4 g 氯化镉放入 500 mL 三口烧瓶中,加蒸馏水溶解后,磁力搅拌下加入 220 μL 巯基乙酸,用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 11.0。通氮除氧 10 min 后,迅速注入新制备的 NaHTe 溶液,在氮气保护下,100℃ 水浴反应 2 h,得到水溶性 CdTe 量子点,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3 鸡肉样品的预处理

鸡肉样品去皮、去骨后取肌肉组织,捣碎机捣碎

(上接第 166 页)

艾塞那肽含量,艾塞那肽质量浓度在 0.04 ~ 0.4 mg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系。专属性实验的结果表明,艾塞那肽在碱性及氧化条件下极不稳定,易降解;在高温条件下稳定性较差;在酸性及光照条件下稳定性相对较好,主峰与杂质峰分离效果较好。精密度实验结果显示,峰面积的 RSD 为 0.52%,表明仪器精密度良好,可信度较高。重复性实验测得的 RSD 为 0.74%,表明此 UPLC 方法重复性良好。稳定性实验表明,艾塞那肽在 8 h 内的稳定性较好。艾塞那肽的平均质量分数均在 98% 以上,满足纯度要求。

综上所述,此 UPLC 方法灵敏度高,重现性好,专属性强,并且,减少了溶剂损耗,节约了成本,提高了分析效率,为艾塞那肽的质量控制提供了可靠的检测方法。另一方面,本研究也填补了 UPLC 法测定艾塞那肽含量领域的空白,具有重要的参考价值。

参考文献

[1] Renate E van Genugten, Daniel H van Raalte, *et al.* Dose glucagon-

后搅拌均匀。称取 5.00 g 样品置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 Mcllvaine-Na₂EDTA 溶液 15 mL,涡旋混匀 1 min,超声提取 10 min,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液。残渣再重复提取 2 次,合并提取液并加入正己烷,充分震荡并静置分层后除去有机层,重复操作 1 次,取下层清液用氮气吹至近干,加入 50% 乙腈水溶液溶解残余物,涡旋混匀 1 min,经 0.22 μm 滤膜过滤后备用。

1.4 金霉素的测定

在 10 mL 比色管中,依次加入 0.4 mL CdTe 量子点、1.0 mL pH 为 6.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液和一定量的金霉素工作溶液,用蒸馏水定容至刻度,混匀。室温下放置 10 min 后,以 330 nm 为激发波长,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,测定体系在 523 nm 处的荧光强度 F ;以同样方法配制不加金霉素的空白液,测定其荧光强度 F_0 ,计算体系相对荧光强度 $\Delta F = F_0 - F$ 。

2 结果与讨论

2.1 CdTe 量子点和金霉素的荧光光谱特性

在室温条件下,考察加入金霉素溶液前后 CdTe 量子点的荧光光谱特性,结果如图 1 所示。由图 1

like peptide-1 receptor agonist therapy add value in the treatment of type 2 diabetes? Focus on exenatide [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2009, 86: 26-34.

[2] 宣吉明,高静,黄景彬,等.艾塞那肽缓释微球的制备和体外释放的研究[J].第二军医大学学报,2011,32(7):772-775.

[3] Liu Bin, Dong Qingguang, M Wang engshu, *et al.* Preparation, characterization, and pharmacodynamics of exenatide-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolic acid) microspheres [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(11): 1474-1479.

[3] 刘玉雪,付金香,赖伊丽,等. RP-HPLC 法测定醋酸艾塞那肽的含量[J].西北药学杂志,2010,25(2):90-91.

[4] Xuan Jiming, Lin Yaling, Huang Jingbin, *et al.* Exenatide-loaded PLGA microspheres with important glycemic control: In vitro bioactivity and in vivo pharmacokinetic profiles after subcutaneous administration to SD rats [J]. *Peptides*, 2013, 46: 172-179.

[5] 石琳,董庆光,王春雨,等. HPLC 法测定注射用艾塞那肽中主药的含量[J].中国当代医药,2009,16(8):122-123.

[6] Li Kun, Yu Lin, Liu Xiaojun, *et al.* A long-acting formulation of polypeptide drug exenatide in treatment of diabetes using an injectable block copolymer hydrogel [J]. *Biomaterials*, 2013, 34: 2834-2842.

[7] Liang Rongcai, Zhang Renyu, X Liang, *et al.* Stability of exenatide in poly(D, L-lactide-co-glycolide) solutions: A simplified investigation on the peptide degradation by the polymer [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 50: 502-510. ■