

HPLC 测定合成胸腺肽 α_1 原料药和有关物质含量

李沿飞¹, 朱琳², 陶凌晖², 蒋文², 苏敏^{2*} (1.重庆市计量质量检测研究院, 重庆 400020; 2.解放军第三军医大学药学院, 重庆 400038)

摘要: 目的 研究胸腺肽 α_1 原料含量测定和有关物质考察方法。方法 采用反相高效液相色谱法测定, Vydac C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.00)-异丙醇(95:5); 柱温: 25℃, 检测波长: 215 nm。结果 胸腺肽 α_1 线性范围为 0.01~0.83 mg·mL⁻¹ ($r=0.9998$)。最低检出量为 10 ng。有关物质含量为 2.5%~2.6%。结论 该方法简便、可靠、准确, 可用于胸腺肽 α_1 含量测定和有关物质考察。

关键词: 胸腺肽 α_1 ; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R979.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)03-0265-04

HPLC Determination of Contents and Related Substances of Synthetic Thymosin α_1

LI Yanfei¹, ZHU Lin², TAO Linghui², JIANG Wen², SU Min^{2*} (1.Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 400020, China; 2.School of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

作者简介: 李沿飞, 男, 硕士, 高级工程师 Tel: (023)89232099 E-mail: ff_ly2001@hotmail.com *通信作者: 苏敏, 男, 博士, 副教授 Tel: (023)68771838 E-mail: sumin@yahoo.cn

中国现代应用药学 2010 年 3 月第 27 卷第 3 期

Chin JMAP, 2010 March, Vol.27 No.3

• 265 •

ABSTRACT: OBJECTIVE To assay the content and related substances of thymosin α_1 . **METHODS** HPLC was exploited to determinate the content and related substances of thymosin α_1 at 215 nm. The separation was performed on Vydac C₁₈ column (250 mm×4.6mm, 5 μ m) with the mobile phase of 0.02 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.00)-isopropanol(95 : 5) under 25 °C. **RESULTS** The linearity was obtained over the range of 0.01–0.83 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 8$). The LOD was 10 ng. Related substances were 2.5%–2.6%. **CONCLUSION** The method is simple, convenient, accurate and can be employed to assay the content and related substances of thymosin α_1 for its quality control.

KEY WORDS: thymosin α_1 ; HPLC

胸腺肽 α_1 是由 28 个氨基酸残基组成的直链多肽, 美国 SciClone 公司(赛生公司)率先合成并上市[商品名: 日达仙(Zadaxin)], 已在全球 21 个国家或地区上市^[1]。1996 年 11 月在中国正式上市。目前临床上主要应用于治疗血清 HBV-DNA 阳性的 18 岁以上的慢性乙型肝炎患者, 其肝病有代偿性和有乙肝病毒复制; 包括接受慢性血液透析和老年病免疫系统功能受到抑制者, 日达仙能增强患者对流感疫苗或乙肝疫苗的免疫应答。血液透析患者研究显示, 接种流感疫苗后, 应用日达仙, 65% 的患者产生抗流感病毒抗体滴度水平增高 4 倍以上^[2-3]。

我国是肝炎大国, 有 10% 的国民为乙肝病毒携带者, 而进口药品售价较高(日达仙在我国市场每盒 2 支售价为 1 813 元)。为了满足广大患者的需要, 笔者进行胸腺肽 α_1 的立项开发研究。胸腺肽 α_1 的测定方法有高效毛细管电泳法^[4]、SEC 色谱技术^[5]等, 目前还无统一的国家标准。为了控制产品质量, 笔者采用高效液相色谱对其含量测定和有关物质检查方法进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2690 液相色谱仪, Waters 996 二极管阵列检测器(美国); 色谱柱: Vydac C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)(美国); Milli-Q 超纯水系统(Millipore, 美国); 日立 L-8500 型氨基酸自动分析仪。

胸腺肽 α_1 对照品(纯度: 99.5%)和原料药由本实验室合成并提供(批号: TA-001S、TA-1、TA-2、TA-3)。其余试剂均为分析纯。

1.2 色谱系统

流动相: 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.00)-异丙醇(95 : 5); 柱温: 25 °C; 检测波长: 215 nm; 进样量: 20 μ L; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

1.3 溶液配制

1.3.1 对照品溶液 精密称取胸腺肽 α_1 对照品 2 mg 溶于 5 mL 纯水中。

1.3.2 样品溶液 精密称取胸腺肽 α_1 原料药 2 mg 溶于 5 mL 纯水中。

1.4 有关物质考察

按中国药典 2005 年版附录二部 V D 项下 HPLC 试验方法。

1.5 含量测定

取样品 2 mg, 精密称量, 放入 5 mL 棕色量瓶中, 加入水溶解并定容。按“1.2”色谱条件进样测定, 按外标法计算含量。

2 结果

2.1 有关物质考察

按“1.5”项下试验, 按照归一化方法计算。试验结果见图 1。3 批样品中有关物质含量分别为 2.5%、2.5%和 2.6%, 低于 5%。

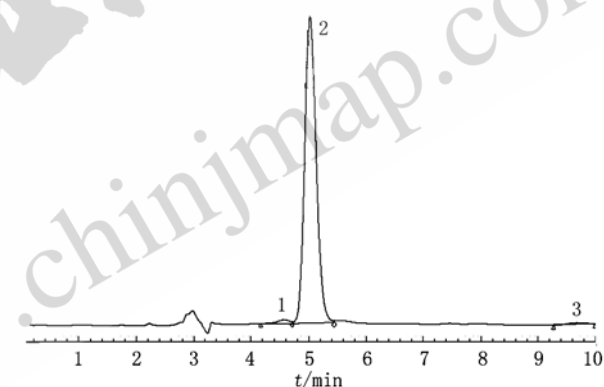


图 1 有关物质考察高效液相色谱图

1, 3—有关物质峰; 2—主成份峰

Fig 1 HPLC chromatogram of the related substances

1, 3—related substance peaks; 2—main component peak

2.2 胸腺肽 α_1 含量测定

2.2.1 系统适用性试验

2.2.1.1 仪器精密度试验 取对照品适量, 精密称定, 加水溶解配成 0.82, 0.41, 0.20 mg·mL⁻¹ 溶液, 每个浓度进样 5 次。并计算理论板数和仪器精密度。结果表明, 理论板数均大于 2000, 进样相对偏差小于 1.0%, 系统能够满足测定要求。

2.2.1.2 线性范围 精密称取本品适量, 用水溶解, 配成分别为 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.11, 0.21, 0.42, 0.83 mg·mL⁻¹ 的溶液, 按“1.2”色谱

条件进样。得到回归方程： $A=12\,775+6.064\times10^6C$ ($r=0.999\,8$)。结果表明，本品在 $0.01\sim0.83\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内具有良好的线性关系。

2.2.1.3 最低检测限 精密称取本品适量，用水溶解并稀释至一定的倍数，按“1.2”色谱条件进样，直至主峰的高度为基线噪音的 3 倍。测得的最低检出量为 10 ng 。

2.2.1.4 稳定性试验 取样品溶液分别于 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h 进样测定，记录峰面积。RSD 为 1.97%，表明样品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.2.1.5 重复性试验 精密称取同一批号样品，按“1.5”项下方法处理，平行 5 份。依法测定计算，含量结果 RSD 为 2.12%。

2.2.2 含量测定 取 3 批样品 2 mg ，精密称量，放入 5 mL 棕色量瓶中，加入水溶解并定容。按“1.2”色谱条件进样测定，按外标法计算含量。含量分别为 98.5%，98.1%，98.6%。

2.2.3 降解产物对测定的影响

2.2.3.1 酸水解 精密称取本品 2.5 mg ，加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 1 mL ，室温放置 24 h。用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 中和，定容至 5 mL 。按“1.2”色谱条件进样，记录色谱图。

2.2.3.2 碱水解 精密称取本品 2.5 mg ，加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 1 mL ，室温放置 24 h，用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中和，定容至 5 mL 。按“1.2”色谱条件进样，记录色谱图。

试验结果表明，酸和碱均使本品降解，降解产物能够与主峰分离，表明降解产物对胸腺肽 α_1 含量测定无影响。

2.2.4 凯氏定氮法验证含量测定法

胸腺肽 α_1 为多肽药物，在紫外末端吸收。为了验证 HPLC 测定法的准确度，采用了经典的凯氏定氮法进行含量测定。具体方法如下：

取经 P_2O_5 干燥至恒重的本品适量($6\sim7\text{ mg}$ ，约相当于含氮量 1 mg)，精密称定，置 50 mL 干燥的凯氏烧瓶中，加 $\text{K}_2\text{SO}_4\ 0.3\text{ g}$ 与 30% CuSO_4 溶液 5 滴，依法测定(中国药典 2005 年版二部附录 VIII 第二法)，馏出液用硫酸滴定液($0.005\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)滴定，每 1 mL 相当于 $0.942\,5\text{ mg}$ 胸腺肽 $\alpha_1(\text{C}_{129}\text{H}_{215}\text{N}_{33}\text{O}_{55})$ 。3 批样品含量分别为 98.3%，98.5%和 98.1%。结果表明，采用 HPLC 和凯氏定氮法测得的含量一致。

2.2.5 肽含量测定验证含量测定法

2.2.5.1 氨基酸组成分析 采用日立 L-8500 型氨

基酸自动分析仪测定样品的氨基酸组见表 1。

表 1 氨基酸组份分析结果

Tab 1 Compositions of amino acids

氨基酸残基	理论值	TA-1 测定值	TA-2 测定值	TA-3 测定值
Asp	4	3.97	3.96	3.97
Thr	3	2.82	2.82	2.82
Ser	3	2.68	2.69	2.69
Glu	6	7.03	7.01	7.03
Ala	3	3.11	3.13	3.10
Val	3	2.28	2.28	2.30
Ile	1	0.96	0.96	0.96
Leu	1	1.05	1.06	1.04
Lys	4	4.08	4.07	4.07

结果表明，3 批胸腺肽 α_1 原料药在实验误差范围内各组分氨基酸含量和理论值基本一致。

2.2.5.2 肽含量 参照英国药典(1999 年版)鲑鱼降钙素(Salcatonin)的质量标准^[6]原料药检查项下肽含量计算方法，依据氨基酸组分分析的结果，进行了肽含量的测定，结果见表 2。结果表明，3 批样品的肽含量均在 90%以上。

按如下公式计算肽含量(P)：

$$P=\frac{310\,840\times(V\times A)}{V_1\times M}$$

A：氨基酸残基(Asp, Glu, Ala, Ile, Leu, Lys)的平均摩尔数；V：水解物终体积(mL)； V_1 ：分析时的进样体积(mL)；M：水解供试品的重量(g)。

表 2 肽含量测定结果

Tab 2 Peptide contents

批号	供试品 重量/mg	水解物终 体积/mg	进样体 积/ μL	肽含量/%
TA-1	3.32	10.0	10.0	93.1
TA-2	4.45	10.0	10.0	91.2
TA-3	4.52	10.0	10.0	92.1

3 讨论

3.1 有关物质检查

胸腺肽 α_1 是具有 28 个氨基酸残基的多肽化合物，采用固相合成法合成得到。因此，不可避免存在与其相关的杂质成分。由于该药物为静脉注射给药，根据药品质量有关要求，必须控制其含量。本试验采用 HPLC 峰面积归一化法对有关物质总含量进行检查，即计算除主成份峰之外的其他杂峰的峰面积百分比之和，作为有关物质总含量。

3.2 检测波长确定

取对照品 2 mg ，精密称量，加入 5 mL 棕色量瓶中，加入水溶解并定容。在 $200\sim600\text{ nm}$ 内扫描。

样品在 200 nm 处有最大吸收。为了方便检测, 选择 215 nm 作为检测波长。

3.3 HPLC 可行性

采用本试验的方法对 3 批样品进行含量测定和有关物质考察, 并用凯氏定氮法和肽含量测定对含量测定进行验证, 测得结果与 HPLC 的测定结果一致。结果表明, 该方法稳定可靠, 具有良好的系统适用性, 能够用于控制胸腺肽 α_1 的质量。

REFERENCES

[1] HUANG Z C, YANG J, ZHOU J L, et al. Immune regulation of thymosin α_1 was studied in severe hepatitis [J]. Chin J Clin

Hepta(临床肝胆病杂志), 2000, 15 (2): 97-99.

- [2] SHA Y, PAN J N. Novel immuno-modulating agent: thymosin alpha 1 [J]. China Pharm(中国药业), 2001, 10(11): 80-81.
- [3] TONG Y W, HUANG A N, ZHENG S Q. The pharmacological behaviors and clinical applications of thymosin alpha 1 [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2003, 7(6): 422-423.
- [4] ZHANG H S, XU K, CHEN W M. Determination of thymosin α_1 in thymopeptide microspheres by high performance capillary electrophoresis [J]. Guangdong Pharm J (广东药学), 2001, 11(5): 11-12.
- [5] CHEN A Y, LIN F, JIANG L X. Approach of thymosin α_1 SEC assays in its formulation [J]. Zhejiang Pract Med(浙江实用医学), 2004, 9(5): 367-368.
- [6] BP [S].1999: 231-233.

收稿日期: 2009-08-06