

HPLC-ELSD 和 IC-ICD 检测磺丁基-β-环糊精中的杂质离子

刘秋连, 胡翮^{*}(湘潭市食品药品检验所, 湖南 湘潭 411100)

摘要:目的 建立了高效液相色谱-蒸发光散射法(HPLC-ELSD)及离子色谱-抑制电导检测法(IC-ICD)测定磺丁基-β-环糊精中氯化钠、4-羟基-1-丁烷磺酸钠、双(4-磺丁基)醚二钠 3 种杂质含量的方法。方法 HPLC-ELSD 采用 CD-Screen-IEC 柱(4 mm×150 mm, 3 μm), 梯度洗脱, 流速为 1.2 mL·min⁻¹; IC-ICD 采用 Dionex IonPac AS19(4 mm×250 mm)阴离子交换色谱柱分离, 30 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液为淋洗液, 等度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果 2 种方法各组分分离度良好, HPLC-ELSD 法中氯化钠、4-羟基-1-丁烷磺酸钠、双(4-磺丁基)醚二钠检出限($S/N=3$)分别为 0.230, 0.270 和 0.340 ng, IC-ICD 法检出限分别为 0.041, 0.027 和 0.014 ng。结论 HPLC-ELSD 和 IC-ICD 在磺丁基-β-环糊精中氯化钠、4-羟基-1-丁烷磺酸钠、双(4-磺丁基)醚二钠 3 种杂质的含量测定结果上没有明显不同, 可根据实际情况选择, 只是根据 2 种方法的检出限及定量限值, IC-ICD 法灵敏度更高。

关键词: 高效液相色谱法; 离子色谱; 磺丁基-β-环糊精; 氯化钠; 4-羟基-1-丁烷磺酸钠; 双(4-磺丁基)醚二钠

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)09-1075-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.09.010

引用本文: 刘秋连, 胡翮. HPLC-ELSD 和 IC-ICD 检测磺丁基-β-环糊精中的杂质离子[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(9): 1075-1079.

Determination of Impurity Ions in Sulfobutyl-β-cyclodextrin by HPLC-ELSD and IC-ICD

LIU Qiulian, HU He^{*}(Xiangtan Institute for Food and Drug Control, Xiangtan 411100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish high performance liquid chromatography-evaporative light scattering(HPLC-ELSD) and ion chromatography-inhibition conductivity detection(IC-ICD) analytical method for sodium chloride, 4-hydroxy-1-butanedisulfonate and bis-(4-sulfobutyl) ether disodium of sulfobutyl-β-cyclodextrin. **METHODS** HPLC-ELSD method was used for assay and related substances test: CD-Screen-IEC column(4 mm×150 mm, 3 μm); gradient elution; flow rate: 1.2 mL·min⁻¹. IC-ICD method was used for assay and related substances test: Dionex Ionpac AS19 column(4 mm×250 mm); mobile phase: 30 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide solution for elution; flow rate: 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** Two methods had good separation of components. The S/N of sodium chloride, sodium 4-hydroxy-1-butane sulfonate and bis-(4-sulfobutyl) ether disodium in HPLC-ELSD method is 0.230, 0.270 and 0.340 ng, respectively. The limit of detection of IC-ICD is 0.041, 0.027 and 0.014 ng. **CONCLUSION** There is no obvious difference between HPLC-ELSD and IC-ICD in three impurities content determination of sodium chloride, 4-hydroxy-1-butanedisulfonate and bis-(4-sulfobutyl) ether disodium of sulfobutyl-β-cyclodextrin. It can be selected according to the actual situation. Only according to the detection limit and quantitative limit of the two methods, IC-ICD has higher sensitivity.

KEYWORDS: HPLC; ion chromatography; sulfobutyl-β-cyclodextrin; sodium chloride; 4-hydroxy-1-butanedisulfonate; bis-(4-sulfobutyl) ether disodium

磺丁基-β-环糊精(SBE-β-CD)是一种高水溶性的新型药用辅料, 由 1,4-丁烷磺内酯与 β-CD 葡萄糖单元的 2, 3, 6 位碳上羟基发生取代反应所得。Ma 等^[1]比较了 SBE-β-CD 和 HP-β-CD 对 2 种抗肿瘤药苯并氨酸氮芥和卡莫司汀稳定性的影响, 发现 SBE-β-CD 的稳定性作用等明显, 这可能与 SBE-β-CD 的结构空穴更加疏水, 反应活性更低, 更适合与这 2 种药物形成复合物有关。由于

SBE-β-CD 带有负电荷, 与带正电荷的药物具有特殊的亲和力, 可以更好地增加药物溶解度, 提高药物生物利用度^[2-3]。相信随着攻克不同药物与不同取代度 SBE-β-CD 包合作用对药效的影响等问题, SBE-β-CD 在口服给药^[4]、鼻部给药^[5]、眼部给药^[6]的应用中会更加广泛。SBE-β-CD 最常见的取代度分别是 4 和 7 的 SBE₄-β-CD 与 SBE₇-β-CD^[7], 取代反应过程中的水解产物氯化钠

基金项目: 湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(湘食药科 R201809)

作者简介: 刘秋连, 女, 硕士, 工程师 Tel: (0731)52345576 E-mail: 3343179pig@163.com *通信作者: 胡翮, 女, 副主任药师 Tel: (0731)52345576 E-mail: 411849862@qq.com

(NaCl)、4-羟基-1-丁烷磺酸钠(4-hydroxy-1-butanefulfonate, 4-HSA)、双(4-磺丁基)醚二钠[bis-(4-sulfobutyl) ether disodium, BSE]有可能作为杂质存在于产品中,因此需要对3种杂质进行限量考察。它们具有不能在反相C₁₈柱上有保留的特性,且无紫外吸收、水溶性好,目前检测方法主要有比浊法^[8]、离子色谱法^[9]及电喷雾质谱法^[10],但都没有同时对3种杂质进行检测。本研究利用HPLC-ELSD法和IC-ICD法分别检测SBE-β-CD中NaCl、4-HSA、BSE 3种杂质,并对2种方法的检测结果进行比较。

1 仪器与试剂

Waters-2695型高效液相色谱仪、2424蒸发光散射检测器(美国Waters公司);CD-Screen-IEC柱(4 mm×150 mm, 3 μm, 匈牙利Cyclolab公司);ICS-900型离子色谱仪、Dionex IonPac AS19分离柱(4 mm×250 mm)、Dionex IonPac AG19(4 mm×50 mm)保护柱、EGC II NaOH自动淋洗发生器、AERS500抑制器(4 mm)、DS5电导检测器、AS自动进样器(美国ThermoFisher公司);AUW220D电子分析天平(日本岛津公司);Elix超纯水仪(美国Millipore公司);PES聚醚砜水相滤膜(0.22 μm, 13 mm, 德国MEMBRANA)。

NaCl对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100376-201703;纯度:100.0%);4-HSA对照品(Toronto Research Chemicals Ins,批号:17-DPP-64-3;纯度:90.0%);BSE对照品(Toronto Research Chemicals Ins,批号:16-DPP-94-2;纯度:90.0%);去离子水(Milli-Q纯水系统制备);SBE-β-CD(A厂家,批号:233-58-3, 233-58-4;B厂家,批号:181202, 181203;原研厂家Captisol公司,批号:180719)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 HPLC-ELSD方法中溶液的制备 对照品溶液:分别精密称取NaCl、4-HSA、BSE对照品适量,加去离子水溶解并稀释成约5 mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品溶液1。供试品溶液:取供试品适量,用去离子水溶解并稀释成约10 mg·mL⁻¹的溶液。用0.22 μm水相微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液即得。

2.1.2 IC-ICD方法中溶液的制备 对照品溶液:

分别精密称取NaCl、4-HSA、BSE对照品适量,加去离子水溶解并稀释成约1.0 mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品储备液1。分别精密量取1 mL对照品储备液1置25 mL量瓶中,用去离子水稀释定容后摇匀,作为对照品溶液2。供试品溶液:取供试品适量,用去离子水溶解并稀释成约5 mg·mL⁻¹的溶液。用0.22 μm水相微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液即得。

2.2 色谱条件

2.2.1 HPLC-ELSD方法条件 色谱柱:CD-Screen-IEC柱(4 mm×150 mm, 3 μm)。流动相A:900 mL水中加入4.0 mL三乙胺,用水稀释至1 000 mL,用无水甲酸调节pH值为4.5;流动相B:乙腈。梯度洗脱:0~2 min, 90%A;2~8 min, 90%→60%A;8~13 min, 60%→40%A;13~20 min, 40%A;20~25 min, 40%→90%A。流速为1.2 mL·min⁻¹;进样量为10 μL;柱温为25℃;ELSD检测器:漂移管温度50℃,氮气压力40.0 psi,增益500。

2.2.2 IC-ICD方法条件 方法采用IonPac AS19阴离子分离柱(4 mm×250 mm), IonPac AG19阴离子保护柱(4 mm×50 mm);AERS300型阴离子抑制器(4 mm);流动相为30 mmol·L⁻¹ KOH;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量为10 μL;柱温为30℃;检测器:抑制型电导检测器, AERS300抑制器(4 mm),抑制电流40 mA,自循环抑制模式。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 系统适应性试验 取HPLC-ELSD方法和IC-ICD方法的样品稀释溶剂、对照品溶液、供试品溶液(批号:233-58-3)分别按“2.2.1”“2.2.2”项下色谱条件进行测试。测定结果表明,在2种色谱条件下,分离度均>1.5,阴性样品在相应处未出峰,对各色谱峰无干扰,见图1~2。

3.1.2 线性范围考察 取对照品储备液1,根据需要定量稀释成一系列混合对照品溶液,按照“2.2.1”“2.2.2”项下色谱条件分别进行测定,考察线性关系。以各对照品浓度(X, μg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,各组分的线性范围、回归方程、相关系数及检出限和定量限见表1。结果表明,在HPLC-ELSD和IC-ICD的条件下,NaCl、4-HSA、BSE线性关系良好。

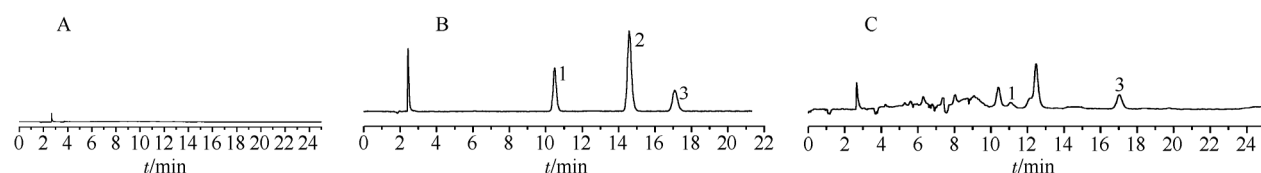


图1 高效液相色谱图

A-空白样品溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-氯化钠; 2-双(4-磺丁基)醚二钠; 3-4-羟基-1-丁烷磺酸钠。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank sample solution; B-standard solution; C-sample solution; 1-sodium chloride; 2-bis-(4-sulfobutyl) ether disodium; 3-4-hydroxy-1-butanefulfonate.

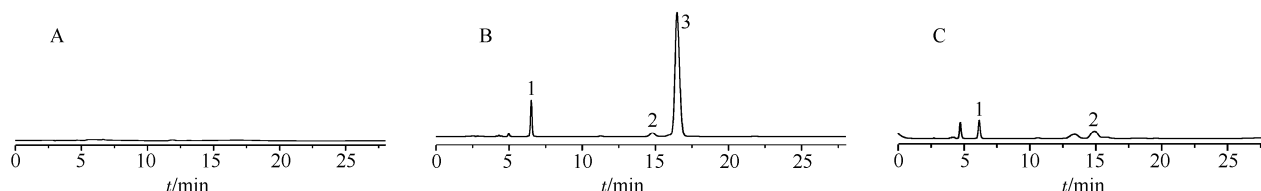


图2 离子色谱图

A-空白样品溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-氯化钠; 2-4-羟基-1-丁烷磺酸钠; 3-双(4-磺丁基)醚二钠。

Fig. 2 Ion chromatograms

A-blank sample solution; B-standard solution; C-sample solution; 1-sodium chloride; 2-4-hydroxy-1-butanefulfonate; 3-bis-(4-sulfobutyl) ether disodium.

表1 各杂质离子的线性范围、回归方程、检出限和定量限

Tab. 1 Linear range, regression equation, detection limit and quantitative limit of impurity ions

组分	方法	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	r	检出限/ng	定量限/ng
NaCl	HPLC-ELSD	1.20~1 040.00	$Y=1\ 748X+3\ 215$	0.999 1	0.230	0.640
	IC-ICD	0.052 0~52.00	$Y=0.295X-0.137$	0.999 0	0.041	0.090
4-HAS	HPLC-ELSD	1.44~1 088.00	$Y=694.9X-177.1$	0.999 1	0.270	0.890
	IC-ICD	0.054 4~54.40	$Y=0.085X-0.017$	0.999 3	0.027	0.042
BSE	HPLC-ELSD	1.12~1 424.00	$Y=1\ 791X+6\ 210$	0.999 3	0.340	0.910
	IC-ICD	0.071 2~71.15	$Y=0.173X-0.019$	0.999 2	0.014	0.037

3.1.3 检测限和定量限 HPLC-ELSD 方法和 IC-ICD 方法中分别以信噪比 $S/N=3$ 时各对照品的质量浓度为检测限,以信噪比 $S/N=10$ 时各对照品的质量浓度为定量限,结果见表 1。HPLC-ELSD 方法中 NaCl、4-HSA、BSE 检测限分别为 0.230, 0.270, 0.340 ng, 定量限分别为 0.640, 0.890, 0.910 ng。IC-ICD 方法中 NaCl、4-HSA、BSE 检测限分别为 0.041, 0.027, 0.014 ng, 定量限分别为 0.090, 0.042, 0.037 ng。

3.1.4 仪器精密度试验 分别取对照品溶液 1 和对照品溶液 2 在“2.2.1”“2.2.2”项下色谱条件下连续进样 6 次,进行分析,结果测得 HPLC-ELSD 方法中 NaCl、4-HSA、BSE 峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.5%和 1.0%($n=6$), IC-ICD 方法中 RSD 分别为 0.9%, 1.0%和 0.7%($n=6$),表明仪器精密度良好。

3.1.5 重复性试验 平行制备 6 份供试品溶液(批号: 233-58-3),按照“2.2.1”“2.2.2”项下色谱条件进行测定,结果样品中未检出 BSE, HPLC-ELSD 方法中 NaCl、4-HSA 测定结果的 RSD 分别为

1.6%, 1.3%, IC-ICD 方法中 RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 表明 2 种方法重复性良好。

3.1.6 稳定性试验 取“2.2.1”“2.2.2”项下供试品溶液各 1 份(批号: 233-58-3),按“2.2.1”“2.2.2”项下色谱条件进行测定,分别在室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样,分别记录峰面积。BSE 未检出, HPLC-ELSD 方法中 NaCl、4-HSA 测定结果的 RSD 为 2.0%, 1.5%, IC-ICD 方法中 RSD 分别为 1.3%, 1.0%, 结果表明供试品溶液在室温放置 24 h 基本稳定。

3.1.7 回收率实验 取供试品溶液(批号: 233-58-4)约 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入 NaCl、4-HSA、BSE 对照品溶液适量,加去离子水溶解并稀释至刻度,依法测定, HPLC-ELSD 方法中 NaCl、4-HSA、BSE 的平均回收率分别为 99.2%, 96.7%, 99.3%, RSD 分别为 0.5%, 0.7%, 0.7%。IC-ICD 方法中 NaCl、4-HSA、BSE 的平均回收率分别为 98.3%, 98.2%, 99.2%, RSD 分别为 0.9%, 1.1%, 0.7%。结果见表 2。

表 2 回收率实验结果

Tab. 2 Results of recovery test

组分	方法	已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加标回 收率/%	平均值/ %	RSD/ %
NaCl	HPLC- ELSD	110.02	115.00	224.03	99.1	99.2	0.5
		110.15	115.00	224.49	99.4		
		110.07	115.00	223.86	98.9		
		100.95	115.00	216.05	100.1		
		110.03	115.00	224.15	99.2		
		110.22	115.00	223.56	98.5		
	IC-ICD	76.83	75.20	150.95	98.6	98.3	0.9
		75.22	75.20	148.39	97.3		
		75.87	75.20	150.39	99.1		
		76.12	75.20	149.87	98.1		
		77.03	75.20	150.15	97.3		
		77.32	75.20	152.06	99.4		
	HPLC- ELSD	21.12	35.50	55.88	96.5	96.7	0.7
		22.36	35.50	57.21	97.1		
		21.69	35.50	56.39	96.3		
		20.97	35.50	55.59	95.8		
		22.04	35.50	57.08	97.9		
		21.65	35.50	56.43	96.7		
4-HSA	IC-ICD	15.37	15.80	30.92	98.4	98.2	1.1
		15.89	15.80	31.47	98.6		
		16.02	15.80	31.69	99.2		
		16.45	15.80	31.67	96.5		
		14.95	15.80	30.33	97.2		
		15.47	15.80	31.18	99.4		
	HPLC- ELSD	未检出	86.40	86.75	100.4	99.3	0.7
		未检出	86.40	85.88	99.4		
		未检出	86.40	85.8	99.3		
		未检出	86.40	85.45	98.9		
		未检出	86.40	85.02	98.4		
		未检出	86.40	86.05	99.6		
	IC-ICD	未检出	12.60	12.65	100.4	99.2	0.7
		未检出	12.60	12.57	99.8		
		未检出	12.60	12.44	98.7		
		未检出	12.60	12.51	99.3		
		未检出	12.60	12.42	98.6		
		未检出	12.60	12.46	98.9		

3.2 样品测定

取 5 批供试品磺丁基-β-环糊精(批号: 233-58-3, 233-58-4, 181202, 181203, 180719), 按“2.1.1”“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进行分析, 记录峰面积, 外标法以峰面积进行计算, 结果见表 3。满足美国药典 USP(40)-NF(35) NaCl≤0.2%、4-HSA≤0.09%以及 BSE≤0.05%的要求^[11]。

表 3 样品中杂质离子的测定结果

Tab. 3 Determination of impurity ions in samples %

批号	方法	NaCl	4-HSA	BSE
233-58-3	HPLC-ELSD	0.10	—	—
	IC-ICD	0.15	—	—
233-58-4	HPLC-ELSD	0.11	0.02	—
	IC-ICD	0.15	0.03	—
181202	HPLC-ELSD	0.09	0.05	—
	IC-ICD	0.10	0.05	—
181203	HPLC-ELSD	0.13	0.03	—
	IC-ICD	0.14	0.04	—
180719	HPLC-ELSD	0.05	—	—
	IC-ICD	0.06	—	—

4 讨论

4.1 分离机制

HPLC-ELSD 采用了 CD-Screen-IEC 柱 (4 mm×150 mm, 3 μm), 是一种新型的特殊固定相用于分析阴离子 CD 衍生物, 固定相为(4-二甲基氨基)芳基烷基-尿素硅胶, 分离过程将离子交换和复杂的形成相互作用结合起来, 实现了离子交换和包合络合物形成的共同作用, 并可以通过改变 pH 值、离子强度和流动相梯度来实现所需的阴离子组分分离^[12-14]。在碱性情况下 NaCl、4-HSA、BSE 均以阴离子的形式存在, 因此 IC-ICD 可以采用阴离子交换色谱法进行分离, 根据美国药典 USP(40)-NF(35)中规定选择 AS11-AG11, 梯度洗脱, 3 种目标物质分离度良好, 但是需要对离子色谱柱更换柱液, 操作较为繁琐, 且等度洗脱目标物分离度达不到要求, 本研究选择 OH⁻选择性高的高容量阴离子交换分离柱 IonPac AS19-AG19 进行分离, 等度洗脱, 3 种目标物分离度好且响应值高^[15-16]。

4.2 方法的选择

2 种方法简便、准确度高及重现性好, 能够满足 SBE-β-CD 中 NaCl、4-HSA、BSE 3 种杂质含量的检测, 解决了 3 种杂质无生色基团的难点, 可用于 SBE-β-CD 质量控制。2 种方法相比之下, HPLC-ELSD 保证了方法的通用性, 该 CD-Screen-IEC 柱可以用于考察 SBE-β-CD 的指纹图谱进行质量控制; 而 IC-ICD 方法采用的抑制性电导检测其显示了更高的灵敏度, 检测限和定量限更低, 在微量检测方面显示出了优越性。

5 结论

本研究建立了 HPLC-ELSD 法和 IC-ICD 法测定磺丁基-β-环糊精中 NaCl、4-HSA、BSE 3 种

杂质的含量测定方法, 结果上没有明显不同, 可根据实际情况选择, 只是根据 2 种方法的检出限及定量限值, IC-ICD 法灵敏度更高, 在微量检测方面显示出了更好的优越性。

REFERENCES

- [1] MA D Q, RAJEWSKI R A, VANDER VELDE D, et al. Comparative effects of (SBE)₇-m-beta-CD and HP-beta-CD on the stability of two anti-neoplastic agents, melphalan and carmustine [J]. J Pharm Sci, 2000, 89(2): 275-287.
- [2] THANH HA P T, VAN SCHEPDAEL A, VAN VAECK L, et al. Chiral capillary electrophoretic method for quantification of apomorphine [J]. J Chromatogr A, 2004, 1049(1/2): 195-203.
- [3] MA D Y, ZHANG Y M, XU J N. The synthesis and process optimization of sulfobutyl ether β -cyclodextrin derivatives [J]. Tetrahedron, 2016, 72(22): 3105-3112.
- [4] XIE J, DU J C, ZHU X Y, et al. Solubilization effect of sulfobutyl ether- β -cyclodextrin on puerarin and preparation of their inclusion complex [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(3): 454-458.
- [5] LOFTSSON T, GUDMUNDSDÓTTIR H, SIGURJÓNSDÓTTIR J F, et al. Cyclodextrin solubilization of benzodiazepines: Formulation of midazolam nasal spray [J]. Int J Pharm, 2001, 212(1): 29-40.
- [6] BARY A R, TUCKER I G, DAVIES N M. Considerations in the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortisone [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(2): 237-244.
- [7] GU F G, GAO Y L, CUI F D. Sulfoethyl ether- β -cyclodextrin -an new excipient and its application in pharmaceutics [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2004, 13(1): 15-19.
- [8] JIN B, ZHAO C H, ZHANG Y H. Rapid determination on trace chloride in zinc hydrometallurgy process liquor by silver chloride turbidimetry [J]. Yunnan Metall(云南冶金), 2015, 44(5): 67-70.
- [9] SU G, LIU Y M, LONG H Y, et al. Determination of chloride ion and sulfate ion in pharmaceutical excipient magnesium stearate by ion chromatography and comparison between different levels of product content [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(12): 2251-2256.
- [10] LU F, XING S S, WANG Y. Determination of methyl p-toluenesulfonate and ethyl p-toluenesulfonate in medroxyprogesterone acetate by LC-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 657-659.
- [11] USP(35)-NF(30)[S]. 2012: Betadex Sulfobutyl Ether Sodium 1906-1910.
- [12] GRARD S, ELFAKIR C, DREUX M. Characterization of sulfobutyl ether-beta-cyclodextrins mixtures by anion-exchange chromatography using evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr A, 2000, 897(1/2): 185-193.
- [13] LIN H L, LIN G B. Quantification of xylooligosaccharides in chitooligosaccharide xylooligosaccharide capsules by HPLC-ELSD [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(6): 876-880.
- [14] WANG E L, XIE Q Q, XU X Y, et al. Simultaneous determination of two saponins in *Lysimachia capillipes* in different harvest time by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(2): 227-233.
- [15] GRARD S, ELFAKIR C, DREUX M. Analysis of sulfobutyl ether- β -cyclodextrin mixtures by ion-spray mass spectrometry and liquid chromatography-ion-spray mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2001, 925(1/2): 79-87.
- [16] LIU Q L. Simultaneous determination of trace amounts of I-, SCN-, ClO₄-and Glyphosate in water by FIA-IC [J]. Food Machinery(食品与机械), 2017, 33(11): 76-79.

收稿日期: 2019-06-05
(本文责编: 李艳芳)