

HPLC 法测定鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质

邢文静, 伏圣青, 韩晓捷*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 建立测定鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质的 HPLC 方法。方法 使用 Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C₁₈AB 色谱柱 (250 mm×4.0 mm, 5 μm); 以 0.04 mol/L 四甲基氢氧化铵溶液 (用磷酸调 pH 2.5) - 乙腈 (9:1) 为流动相 A, 以 0.04 mol/L 四甲基氢氧化铵溶液 (用磷酸调 pH 2.5) - 乙腈 (4:6) 为流动相 B, 梯度洗脱; 检测波长为 220 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 100 μL; 柱温为 65 °C; 样品室温度: 10 °C。按加校正因子的主成分自身对照法计算降钙素 C、N-乙酰半胱氨酸鲑降钙素 (杂质 A)、9-D-亮氨酸鲑降钙素 (杂质 B)、去-22-酪氨酸鲑降钙素 (杂质 C)。结果 降钙素 C 和鲑降钙素杂质 A、B、C 在 0.20~7.50 μg/mL 线性关系良好, 平均回收率分别为 98.1%、98.9%、100.5%、99.7%, RSD 值分别为 1.6%、1.5%、1.0%、1.1%。杂质 A、B、C 的校正因子均超出 0.90~1.10。结论 方法简便、快速, 可作为鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质的检测方法。

关键词: 鲑降钙素鼻用喷雾剂; 降钙素 C; N-乙酰半胱氨酸鲑降钙素; 9-D-亮氨酸鲑降钙素; 去-22-酪氨酸鲑降钙素; 高效液相色谱; 加校正因子的主成分自身对照法

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)02-0348-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.011

Determination of related substance in Salmon Calcitonin Nasal Spray by HPLC

XING Wenjing, FU Shengqing, HAN Xiaojie

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of related substance in Salmon Calcitonin Nasal Spray.

Methods The separation was performed on Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C₁₈AB column (250 mm × 4.0 mm, 5 μm). The mobile phase A was 0.04 mol/L tetramethyl ammonium hydroxide buffer (adjusted with phosphoric acid to pH 2.5) - acetonitrile (9:1), and the mobile phase B was 0.04 mol/L tetramethyl ammonium hydroxide buffer (adjusted with phosphoric acid to pH 2.5) - acetonitrile (4:6), with gradient elution. The detection wavelength was 220 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, injection volume was 100 μL, column temperature was 65 °C, and sample temperature was 10 °C. The contents of calcitonin C and N-acetylcysteine salmon calcitonin (impurity A), 9-D-leucine salmon calcitonin (impurity B), and de-22-tyrosine salmon calcitonin (impurity C) were determined by principal component self-control with correction factor. **Results** The linear ranges of calcitonin C and impurity A, B, and C were all 0.20 — 7.50 μg/mL. The average recoveries were 98.1%, 98.9%, 100.5%, and 99.7% with RSD values of 1.6%, 1.5%, 1.0%, and 1.1%, respectively. The correction factors of impurity A, B, and C were all above 0.90 — 1.10. **Conclusion** The method is simple, rapid, and can be used for the determination of related substances in Salmon Calcitonin Nasal Spray.

Key words: Salmon Calcitonin Nasal Spray; calcitonin C; N-acetylcysteine salmon calcitonin; 9-D-leucine salmon calcitonin; de-22-tyrosine salmon calcitonin; HPLC; principal component self-control with correction factor

鲑降钙素是一种骨代谢调节药, 能调节成骨细胞活性, 抑制体内破骨细胞, 还能改善患者骨吸收, 适用于骨质疏松症、骨质减少引起的骨痛、畸形性骨炎、高血钙症和神经营养不良症等^[1-5]。鲑降钙素制剂主要有鲑降钙素注射液、鲑降钙素鼻用喷雾

剂, 而鲑降钙素鼻用喷雾剂比鲑降钙素注射液更易被患者接受。《中国药典》2020 年版二部收载了鲑降钙素、鲑降钙素注射液和注射用鲑降钙素的质量标准^[6]。在已收载的制剂中有关物质检查项下, 对降钙素 C 进行了限定, 并未对其他具体杂质做出要

收稿日期: 2023-10-19

作者简介: 邢文静 (1988—), 女, 研究实习员, 硕士, 主要从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: xwj0822@126.com

*通信作者: 韩晓捷 (1980—), 女, 副研究员, 从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: hxjtjdc@163.com

求。现行版《欧洲药典》(EP11)^[7]、《美国药典》(USP43)^[8]和《日本药典》(JP18)^[9]收录了鲑降钙素,并且 EP11 中将 *N*-乙酰半胱氨酸鲑降钙素、9-*D*-亮氨酸鲑降钙素、去-22-酪氨酸鲑降钙素作为已知杂质进行了控制,明确了其限度。鲑降钙素作为人工合成多肽类药物,具有不稳定、易降解的特点,需对鲑降钙素产品中杂质进行严格控制^[10]。本实验采用高效液相色谱-加校正因子的主成分自身对照法测定了鲑降钙素鼻用喷雾剂中杂质,方法准确、可靠、专属性强,为鲑降钙素鼻用喷雾剂的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试验

Waters e2695 高效液相色谱仪,配备 2489 紫外检测器;梅特勒托利多 XS205 十万分之一电子天平。

鲑降钙素对照品(批号 140665-201804,质量分数 89.7%,中国食品药品检定研究院);降钙素 C 对照品(批号 140808-201802,质量分数 88.2%,中国食品药品检定研究院);*N*-乙酰半胱氨酸鲑降钙素(杂质 A,批号 1086210-R06010,质量分数 100%,USP);9-*D*-亮氨酸鲑降钙素(杂质 B,批号 4022-001A1,质量分数 96.8%,TLC);去-22-酪氨酸鲑降钙素(杂质 C,批号 4022-061A1,质量分数 93.5%,TLC);鲑降钙素鼻用喷雾剂样品来自瑞士 Future Health Pharma GmbH 公司,规格 2 mL:4 400 IU,批号分别为 DH100102、DH100103、DH100108;四甲基氢氧化铵 25%水溶液(分析纯),磷酸(分析纯),乙腈(色谱纯),超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C₁₈AB 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm);以 0.04 mol/L 四甲基氢氧化铵溶液(用磷酸调 pH 2.5) - 乙腈(9:1)为流动相 A,以 0.04 mol/L 四甲基氢氧化铵溶液(用磷酸调 pH 2.5) - 乙腈(4:6)为流动相 B,梯度洗脱(0~30 min,流动相 A 从 72%降至 50%;30~35 min,流动相 A 从 50%降至 5%;35~45 min,流动相 A 保持 5%;45~49 min,流动相 A 从 5%增加至 72%;49~60 min,流动相 A 保持 72%);检测波长为 220 nm;体积流量为 1.0 mL/min;进样量为 100 μL;柱温为 65 °C;样品室温度:10 °C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取鲑降钙素、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品各 10

mg,分别置 20 mL 量瓶中,加流动相 A 溶解,分别制成 0.5 mg/mL 的对照品贮备液。

2.2.2 杂质定位溶液的制备 分别精密量取降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品贮备液适量,加流动相 A 稀释,均制成 5 μg/mL 杂质定位溶液。

2.2.3 系统适用性溶液的制备 分别精密量取鲑降钙素、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品贮备液各 1 mL,置同一个 100 mL 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度,即得。

2.2.4 混合对照品溶液的制备 分别精密量取降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品贮备液各 1 mL,置于同一个 100 mL 量瓶中,用流动相 A 稀释至刻度,制成含各杂质对照品约 5 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.5 供试品溶液的制备 精密称取鲑降钙素鼻用喷雾剂 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相 A 稀释至刻度,即得。

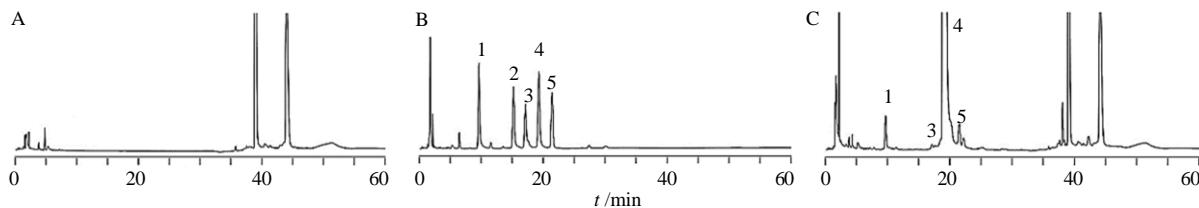
2.2.6 自身对照溶液 精密量取鲑降钙素鼻用喷雾剂 5 mL,置 200 mL 量瓶中,用流动相 A 稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.7 空白辅料溶液 按鲑降钙素鼻用喷雾剂的处方称取各辅料适量,溶解,制备空白辅料溶液。

2.3 专属性和系统适用性试验

2.3.1 系统适用性试验 分别取空白辅料溶液、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 杂质定位溶液、系统适用性溶液、鲑降钙素鼻用喷雾剂供试品溶液(批号 DH100102)各 100 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。结果显示流动相 A 和空白辅料对主峰和杂质测定均无干扰;各成分分离良好,鲑降钙素主峰与杂质 A 分离度为 4.0,符合要求。降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 相对保留时间分别为 0.5~0.6、1.15、0.8、0.9。

2.3.2 破坏实验 分别取鲑降钙素鼻用喷雾剂 5 mL,置 10 mL 量瓶中,进行高温(60 °C 放置 6 h)、强酸(1 mol/L 盐酸溶液 1 mL 放置 1 h,中和)、强碱(1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 放置 10 min,中和)、强光照(4 500 lx 下照射 48 h)、强氧化(加入 30%双氧水 1 mL 放置 1 h)作用后,分别加流动相 A 稀释至刻度,进样测定。结果鲑降钙素鼻用喷雾在光照、强酸、氧化条件下相对稳定;在高温条件下,降钙素 C、杂质 B、杂质 C 有明显增加,杂质 A 略有增加;在强碱条件下,杂质 B、杂质 C 有明显增加,各主要降解杂质之间、杂质与主峰之间均



1-降钙素 C; 2-杂质 B; 3-杂质 C; 4-鲑降钙素; 5-杂质 A。
1-calcitonin C; 2-impurity B; 3-impurity C; 4-salmon calcitonin; 5-impurity A.

图 1 空白辅料溶液 (A)、系统适用性试验溶液 (B) 和鲑降钙素鼻用喷雾剂 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of pharmaceutical excipients solution (A), system suitability solution (B), and Salmon Calcitonin Nasal Spray (C)

能有效分离, 且物料平衡, 说明此方法对杂质能有效分离和检测。

2.4 校正因子和线性范围考察试验

精密量取鲑降钙素、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品贮备液适量, 加流动相 A 分别均稀释制成 0.20、1.25、2.5、3.75、5、6.25、7.50 $\mu\text{g/mL}$ 对照品系列溶液, 进样测定, 记录色谱图。以质量

浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 计算回归方程, 用标准曲线法计算杂质的校正因子, 结果见表 1。结果表明, 鲑降钙素及其杂质均在 0.20~7.50 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 杂质 A、B、C 的校正因子均超出 0.90~1.10, 因此有关物质检查项下已知杂质可按加校正因子的主成分自身对照法计算。

表 1 线性关系和校正因子

Table 1 Linear relationship and correction factor

成分	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	校正因子
鲑降钙素	$Y=46\ 871 X-12\ 394$	0.999 2	0.20~7.50	—
降钙素 C	$Y=48\ 645 X-3\ 254$	0.999 8	0.20~7.50	0.96
杂质 A	$Y=40\ 665 X-6\ 028$	0.997 2	0.20~7.50	1.15
杂质 B	$Y=38\ 485 X-4\ 554$	0.999 6	0.20~7.50	1.22
杂质 C	$Y=28\ 471 X-2\ 803$	0.999 7	0.20~7.50	1.65

2.5 检测限和定量限考察

取对照品贮备液, 用流动相 A 逐步稀释, 进样测定, 记录色谱图, 以信噪比为 3 时对应的质量浓度作为检测限, 以信噪比为 10 时对应的质量浓度作为定量限, 结果鲑降钙素、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 的检测限分别为 25、26、23、29、25 ng, 定量限分别为 83、51、46、57、82 ng。

2.6 重复性试验

取鲑降钙素鼻用喷雾剂 (批号 DH100102), 平行 6 份, 制备自身对照溶液和供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 结果降钙素 C、杂质 A、杂质 C 的平均质量浓度分别为 0.80%、0.67%、0.17%, RSD 值分别为 0.9%、1.1%、1.6%。杂质 B 低于定量限。

2.7 精密度试验

2.7.1 仪器精密度试验 取系统适用性溶液, 连续

进样 6 次, 计算峰面积, 结果鲑降钙素、降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 峰面积的 RSD 值分别为 0.6%、0.7%、1.3%、0.9%、0.8%。

2.7.2 中间精密度试验 分别以不同人员 (2 人)、不同时间、不同仪器按 2.6 项下方法分析。结果降钙素 C、杂质 A、杂质 C 的平均质量浓度的 RSD 值分别为 1.0%、1.3%、1.5%。杂质 B 低于定量限。

2.8 稳定性试验

取系统适用性溶液于 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 分别于 0、2、4、8、20 h 进样测定, 结果降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 峰面积的 RSD 值分别为 0.5%、1.0%、1.3%、0.8%, 表明供试品溶液于 10 $^{\circ}\text{C}$ 放置时 20 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验

精密取鲑降钙素鼻用喷雾剂 (批号 DH100102)

5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 分为 3 组, 分别加入混合对照品溶液 80、100、120 μL , 加入流动相 A 至刻度, 制成加标浓度相当于杂质限度 80%、100%、120% 的溶液, 每个质量浓度制备 3 份, 进样测定, 计算回收率, 结果降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 平均回收率分别为 98.1%、98.9%、100.5%、99.7%, RSD 值分别为 1.6%、1.5%、1.0%、1.1%。

2.10 耐用性试验

考察在流动相 pH 值 ± 0.2 、体积流量变化 ± 0.1 mL/min、柱温变化 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 、波长变化 ± 2 nm、流动相比例变化 $\pm 2\%$ 的条件下对测定结果的影响。结果在各条件下系统适用性均符合要求, 各已知杂质测

定结果 RSD 值均小于 10%, 未知杂质总量测定结果的 RSD 值小于 10%, 提示色谱系统参数耐用性良好。

2.11 样品测定

取鲑降钙素鼻用喷雾剂 3 批, 分别制备混合对照品溶液、供试品溶液和自身对照溶液, 进样测定, 分别按加校正因子的主成分自身对照法 (方法 I) 和主成分外标法 (方法 II) 计算有关物质的质量浓度, 结果见表 2。参考《欧洲药典》(EP11)、《美国药典》(USP43) 中对已知杂质、单个未知杂质和总杂质的限度要求, 对 3 批鲑降钙素鼻用喷雾剂样品进行了检测, 结果均符合标准规定。

表 2 鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质测定结果 ($n = 2$)

Table 2 Determination of related substances in in Salmon Calcitonin Nasal Spray ($n = 2$)

批号	降钙素 C/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		杂质 A/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		杂质 B/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		杂质 C/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		其他最大杂质/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	其他杂质之和/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	I	II	I	II	I	II	I	II		
DH100102	1.6	1.6	1.6	1.5	—	—	0.6	0.6	1.6	3.7
DH100103	1.9	1.9	1.5	1.6	—	—	0.5	0.5	1.6	3.8
DH100108	1.5	1.5	0.8	1.0	—	—	0.3	0.4	1.0	2.7

3 讨论

根据现行版《欧洲药典》(EP11)、《美国药典》(USP43) 中鲑降钙素、鲑降钙素注射液和注射用鲑降钙素中有关物质检查的色谱条件, 色谱柱均采用 C_{18} 柱, 流动相均采用四甲基氢氧化铵溶液 - 乙腈体系, 检测波长均为 220 nm, 柱温均为 65 $^{\circ}\text{C}$ 。经过色谱条件的筛选和优化, 调整流动相比例达到较好的杂质分离效果, 并排除辅料干扰, 同时分别考察了 Vydac C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C_{18}AB (250 mm \times 4.0 mm, 5 μm) 3 种不同品牌型号的 C_{18} 色谱柱, 所得图谱显示主峰与降钙素 C、杂质 A、杂质 B、杂质 C 以及其他相邻杂质的分离度均符合要求, 方法适用性较强。

《中国药典》2020 年版二部、《欧洲药典》(EP11)、《美国药典》(USP43) 中均采用峰面积归一化法控制鲑降钙素中有关物质的限量, 但由于各杂质与主成分的响应因子不同, 采用峰面积归一化法测定杂质结果会产生误差。本实验以鲑降钙素为对照, 以主成分回归直线斜率与杂质回归直线斜率的比计算校正因子, 用于校正杂质的实测峰面积。

结果采用加校正因子的主成分自身对照法可更准确地测定鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质。因此, 在杂质对照品较难获得或造价过高的情况下, 引入校正因子更便捷准确。

现行版各国药典中均规定鲑降钙素中有关物质的限量, 《欧洲药典》(EP11) 中明确了已知杂质的限度, 《美国药典》(USP43) 收录了鲑降钙素鼻用制剂, 但并未规定制剂中有关物质限度。本实验规定了 4 种已知杂质, 其中杂质 A、B、C 为鲑降钙素固相合成中引入的杂质, 而降钙素 C 为鲑降钙素鼻用喷雾剂中主要降解杂质, 降钙素 C 含量变化是表征该制剂稳定性的重要指标。

综上, 本研究建立了鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质检查的 HPLC 测定法, 测定了已知杂质降钙素 C 和杂质 A、B、C, 并进行了方法学验证, 结果表明, 该方法简便、快速, 可作为鲑降钙素鼻用喷雾剂中有关物质的检测方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li N, Gong Y C, Chen J. A meta-analysis of the therapeutic effect of intranasal salmon calcitonin on osteoporosis [J]. *Eur J Med Res*, 2021, 26(1): 140.

- [2] 王琦. 骨愈灵片联合鲑降钙素治疗老年骨质疏松症胸腰椎压缩性骨折的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(6): 1486-1489.
- [3] 张伟, 刘兆力, 汤波, 等. 骨力胶囊联合鲑鱼降钙素注射液治疗老年骨质疏松症的效果及对骨代谢指标的影响 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(6): 107-110.
- [4] 蒋满香, 黄璐璐, 周兴, 等. 鲑降钙素联合钙剂对骨质疏松症患者的疼痛护理干预研究 [J]. 药品评价, 2019, 16(20): 51-52.
- [5] 周飞, 易松, 孙群. 鲑降钙素鼻用喷雾剂辅助治疗对内分泌失调性骨质疏松症患者骨密度及骨转化标志物水平的影响 [J]. 中国医药, 2021, 16(9): 1374-1378.
- [6] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 1784-1787.
- [7] 欧洲药典 [S]. EP11: 2161-2163.
- [8] 美国药典 [S]. USP43-NF38: 670-675.
- [9] 日本药典 [S]. JP18: 591-594
- [10] 于芝颖, 任晓蕾, 李玉. 在模拟流通和使用条件下鲑降钙素鼻喷剂的稳定性 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(4): 298-230.

[责任编辑 解学星]