

# HPLC 测定聚乙二醇修饰科博肽含量

任晚琼 (河南欣泰药业有限公司, 河南 驻马店 463000)

**摘要:** 目的 测定聚乙二醇修饰科博肽含量。方法 采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱条件为 C<sub>8</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 0.1%三氟醋酸溶液为流动相 A, 三氟醋酸-80%乙腈(1:1 000)为流动相 B, 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 221 nm。结果 该法的线性范围为 51.6~258 μg·mL<sup>-1</sup>,  $r=0.999\ 4$ , 回收率为 99.9%, RSD=0.50%( $n=9$ )。结论 本法简便、准确、重复性好, 可作为聚乙二醇修饰科博肽的含量测定方法。

**关键词:** 聚乙二醇修饰科博肽; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)11-0940-04

## Determination of PEG-CBT by HPLC

REN Wanqiong (*Henan Xintai Pharm. Co., Zhumadian 463000, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the content of PEG-CBT. **METHODS** The content of PEG-CBT was determined by HPLC with C<sub>8</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase were combined with solution A (0.1% trifluoroacetic acid) and solution B (trifluoroacetic acid-80% acetonitrile (1:1 000)). The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 221 nm. **RESULTS** The linear range was 51.6-258 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 4$ ). The average recovery rate was 99.9%, and RSD was 0.50%( $n=9$ ). **CONCLUSION** The method is simple, accurate, and reproducible and can be used for the determination of PEG-CBT. **KEY WORDS:** PEG-CBT; HPLC; determination

科博肽(cobratide, CBT)是从眼镜蛇毒中分离提纯的低分子多肽, 临床上有良好的镇痛效果, 具有无成瘾性、无耐受性, 镇痛作用持久, 使用方便的特点<sup>[1-2]</sup>, 适用于慢性、顽固性、持续性疼痛治疗, 出现疗效后可减量维持<sup>[3-5]</sup>。但对人体而言 CBT 属异源蛋白, 在使用过程中具有蛋白质类药物所共

有的特点, 如具有免疫原性、半衰期短、稳定性差等, 由 CBT 引起的过敏反应已有报道<sup>[6-7]</sup>。聚乙二醇修饰科博肽(pegylated cobratide, PEG-CBT)是利用聚乙二醇修饰技术对科博肽进行化学修饰的一种新药, 初步动物实验显示镇痛效果比同剂量的吗啡等镇痛药疗效持久, 且无依赖性和耐受性, 毒性

作者简介: 任晚琼, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0396)2969886

E-mail: ztrwq@263.net

低<sup>[8]</sup>, 稳定性高, 动物体内半衰期长, 因而疗效持久。目前笔者正在进行该药的长期毒性、一般药理学等临床前药理毒理试验, 开展药品质量控制、稳定性等临床前药学研究工作。本试验内容是, 建立聚乙二醇修饰科博肽的含量测定方法, 为质量标准的制定提供依据。亦有采用酚试剂法测定聚乙二醇修饰眼镜蛇神经毒素的报道<sup>[9]</sup>, 但对 PEG-CBT 尚无采用 HPLC 的报道, 为此, 笔者根据中国药典“药品质量标准质量分析方法验证”<sup>[10]</sup>、国家药品审评中心颁布的相关药品研究指导原则, 对分析方法进行了如下研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

高效液相色谱仪: LC-10A, 日本岛津公司生产; LC-10A 紫外可见波长检测器; N2000 色谱工作站; PEG-CBT 对照品, 河南欣泰药业有限公司精制, 批号: 2007001, 含量为 100%(HPLC 面积归一化法), 炽灼残渣为 0.1%; PEG-CBT 样品由河南欣泰药业有限公司提供, 批号: 20071101, 20071102, 20071103; 乙腈、甲醇、三氟乙酸为色谱纯, 水为注射用水, 其他试剂为分析纯。

### 1.2 色谱条件

迪马公司 C<sub>8</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);

流动相: 流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸水溶液, 流动相 B 为三氟乙酸-80% 乙腈溶液(1:1 000)。初始状态流动相 B 为 8%, 保持 4 min, 在 20 min 内, 流动相 B 增至 75%, 保持 4 min, 再在 5 min 内回到初始状态, 保持 7 min; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 221 nm; 柱温 45 °C。

### 1.3 溶液制备

对照品溶液配制: 精密称取 PEG-CBT 对照品 100 mg 置 100 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 混匀, 制成每 1 mL 中含 1 mg 的溶液。样品溶液配制: 称取 PEG-CBT 样品适量, 加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 制成 150 μg·mL<sup>-1</sup> 样品溶液。阴性溶液: 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液。

## 2 结果

### 2.1 系统适用性试验

称取 PEG-CBT 工艺过程的中间品适量, 加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 制成 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 样品溶液, 进样量 20 μL; 另精密量取 PEG-CBT 对照品溶液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液至刻度, 混匀。进样量 20 μL, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 样品主峰的分离度大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.05 内, 均符合要求。

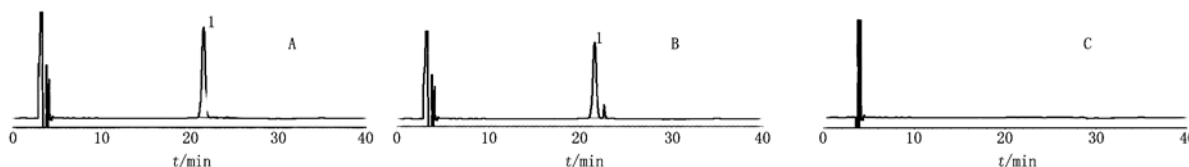


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性溶液; 1-聚乙二醇修饰科博肽

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substance sample; B-sample solution; C-negative solution; 1-PEG-CBT

### 2.2 专属性试验

分别取“1.3”项下对照品溶液 4 mL, 各加 2 mol·L<sup>-1</sup> 的盐酸溶液 1 mL、2.5 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠溶液 1 mL、等体积双氧水、等体积注射用水, 在水浴

上加热 2 h, 进行强酸、强碱、氧化破坏和热破坏; 调 pH 至中性, 用流动相稀释制成每 1 mL 中约含 PEG-CBT 100 μg 的溶液, 进样量 20 μL。结果显示, PEG-CBT 与各分解产物均能得以有效的分离, 见图 2。

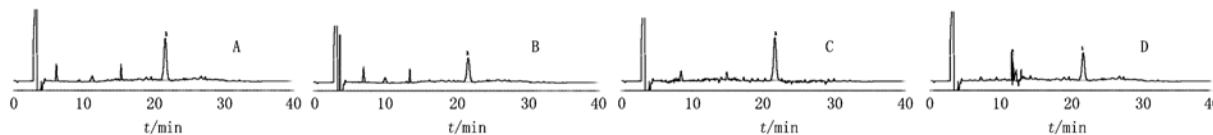


图 2 HPLC 色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-热破坏试验; 1-聚乙二醇修饰科博肽

Fig 2 HPLC chromatograms

A-the acid destroyed test; B-the base destroyed test; C-the oxidative destroyed test; D-the heat destroyed test; 1-PEG-CBT

### 2.3 准确度

取甘氨酸 100 mg, 加 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液溶

解, 置 100 mL 量瓶中, 另取科博肽和丙酸甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺酯 5000 (mPEG succinimidyl

propionate Mr=5 000, mPEG SPA5 000)各 100 mg, 置此量瓶中, 加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 为混合液; 精密量取对照品溶液 0.9, 1.5, 2.1 mL 分别于 10 mL 量瓶中, 各加入混合溶液 1 mL, 加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液稀释至刻度, 为 3 个样品溶液; 进样量  $20 \mu\text{L}$ , 每个样品溶液进样 3 次, 测定 PEG-CBT 的峰面积, 带入标准曲线, 以外标法计算样品溶液的含量, 计算回收率, 平均回收率: 99.92%, RSD=0.50%( $n=9$ )。

#### 2.4 精密度的试验

精密量取对照品溶液 1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液至刻度, 为对照溶液, 进样量  $20 \mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测定 PEG-CBT 峰面积, 结果分别为 1 041 086、1 030 329、1 022 820、1 034 193、1 028 173、1 030 332, RSD 为 0.59%。

#### 2.5 稳定性试验

取“2.4”项下对照溶液, 进样量  $20 \mu\text{L}$ , 分别在 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 h 测定 PEG-CBT 峰面积, 结果分别为 1 041 086、1 022 820、1 028 173、1 032 195、1 029 267, RSD 为 0.59%, 表明样品在 8 h 内稳定。

#### 2.6 线性关系考察

精密量取对照品溶液, 分别制成浓度为 51.6, 103.2, 154.8, 206.4 和  $258.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 进样量  $20 \mu\text{L}$ , 测定 PEG-CBT 峰面积, 以峰面积为纵坐标, 样品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 线性方程:  $Y=9.064\times 10^4 X-6.478\times 10^4$ ,  $r=0.9994$ 。表明 PEG-CBT 在  $51.6\sim 258.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性良好。

#### 2.7 样品测定

取 PEG-CBT 样品溶液, 进样量  $20 \mu\text{L}$ ; 另精密量取 PEG-CBT 对照品溶液 1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液至刻度, 混匀, 进样量  $20 \mu\text{L}$ ; 按外标法以峰面积计算样品溶液的含量。结果见表 1。

表 1 样品测定结果

Tab 1 Determination results of sample

批号	含量测定/%
20071101	99.5
20071102	98.8
20071103	98.9

### 3 讨论

科博肽的国家药品标准(WS1-XG-009-2000)中采用酚试剂法对其含量进行确定, 干扰因素较多,

易造成实验结果的误差。笔者采用 HPLC, 可克服酚试剂法的缺点, 使结果更准确, 且不容易受其他成分的干扰。

#### 3.1 最大紫外吸收波长的确定

科博肽被聚乙二醇衍生物修饰后, 理化性质发生较大变化, 科博肽分子量为 7 000 道尔顿, 修饰后增加到 12 000 道尔顿。科博肽表面暴露的自由氨基也被部分覆盖, 被修饰前, 科博肽在 215 nm 和 277 nm 处有最大吸收, 而聚乙二醇修饰科博肽在 221 nm 处有最大紫外吸收, 可能是因为科博肽部分肽键被单甲基聚乙二醇链覆盖, 导致最大吸收峰发生了位移。

#### 3.2 流动相的确定

聚乙二醇并未将科博肽分子全部覆盖, 因而聚乙二醇修饰科博肽仍具有科博肽的某些性质。本试验参考科博肽国家药品标准纯度检查方法, 选用了辛基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱( $4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$ ); 并考虑到乙腈黏度低、和水以任一比例组成的流动相对蛋白质及多肽的溶解率高, 广泛用于蛋白质、多肽的分析, 所以本试验确定将乙腈、三氟乙酸、水作为流动相的组成成分。试验了多种流动相比例, 如 100%, 75%以及 50%流动相 B 等, 科博肽国家药品标准所用的乙腈最大浓度仅为 20%, 而试验中 50%的乙腈也无法将聚乙二醇修饰科博肽从色谱柱上洗脱下来, 最后选定“1.2”项下的流动相比例为最佳流动相比例, 此系统可使 PEG-CBT 与其他峰基线分离。分离度大于 1.5, 理论板数按 PEG-CBT 峰计不少于 3 000。

#### 3.3 准确度的考察

PEG-CBT 制备原料为 CBT 和 mPEG SPA 5 000, 反应完成后加入过量甘氨酸终止反应, 如果后续纯化工序不合理, 可能导致产品中残留科博肽、mPEG SPA 5 000 与甘氨酸反应产物或接入两个甚至多个 mPEG SPA 5 000 的科博肽, 这些物质可能干扰 PEG-CBT 的测定, 为了考察这些影响因素, 对测定方法进行了回收率试验, 回收率为 99.92%( $n=9$ )。

### REFERENCES

- [1] LI Q, XU Y M, YANG H P. Observation of analgesic effect of cobratide on 7 cases of advanced cancer [J]. Chin J Pain Med(中国疼痛医学杂志), 2003, 9(1): 40-43.
- [2] ZHU T X, LIU G L, JI T P, et al. The analgesic effect of injectable cobra neurotoxin purified judged by the national standard in clinic [J]. J Snake(蛇志), 1999, 11(4): 43-46.
- [3] XIONG Y, WANG W, SONG J. Preliminary study on the

- mechanism of using snake venoms to substitute for morphine [J]. *Toxicon*, 1992, 30(5-6): 567-568.
- [4] YANG L, LI H, WU Y X, et al. Observation of curative effect of  $\alpha$ -cobratoxin capsule on heroin addiction [J]. *Med Pharm YunNan(云南医药)*, 1995, 16(1): 42-44.
- [5] ZHANG X D, GUO X H, ZHAO T S, et al. Study of detoxification treatment of compound keluoqu tablet on heroin dependence [J]. *Chin Mag Drug Abuse Prev Trea (中国药物滥用防治杂志)*, 1998, 13(2): 45-47.
- [6] LIU W, CHEN H, ZHENG H. Anaphylactic shock caused by keluoqu tablet [J]. *Adverse Drug React J (药物不良反应杂志)*, 2001, 3(3):196.
- [7] Harris J M, Chess R B. Effect of pegylation on pharmaceuticals [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 214-221.
- [8] REN W Q, ZHU T X, LIU Y J, et al. Peglated Cobratide, Preparation Method and Use: China, 200510017817.0 [P]. 2006-02-08.
- [9] ZAI N. Study of peglated cobra neurotoxin [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry (SIPI), 2006.
- [10] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 年版.二部)[S]. 2005: 172-173.

收稿日期: 2009-04-16