

毛细管电泳方法测定磺丁基-β-环糊精的平均取代度

Analyzing the Average Degree of Substitution of Betadex Sulfobutyl Ether Sodium by Capillary electrophoresis

张晓霞¹, 高铁¹, 许凯², 陈泓序¹

Xiaoxia Zhang¹, Tie Gao¹, Kai Xu², Hongxu Chen¹

¹ SCIEX, 中国; ² 中国食品药品检定研究院

¹ SCIEX, China; ² National Institute for Food and Drug Control

Keywords: Average degree of substitution; Betadex Sulfobutyl Ether Sodium(SBE-β-CD); Capillary electrophoresis

1. 前言

磺丁基-β-环糊精(SBE-β-CD)是美国Cydex公司开发成功的阴离子、高水溶性的β-CD衍生物,能很好地与药物分子形成非共价复合物。与β-CD相比,其具有更好的水溶性,且溶血作用小、肾毒性低,是一种应用前景非常广阔的药用辅料。

毛细管电泳技术利用高压电场进行样品分离,非常适合用于带电的物质和极性物质的分离分析。美国药典方法规定用毛细管电泳方法进行磺丁基-β-环糊精平均取代度的分析^[1]。药典详细规定了毛细管电泳的仪器条件和冲洗步骤。由于毛细管之间的差异,美国药典(USP)并没有指定背景电解质的pH值,需要根据实际的情况进行优化选择。

本研究基于SCIEX熔融石英毛细管,用三个不同pH值的背景电解质分别进行磺丁基-β-环糊精标准溶液平均取代度分析实验。结果显示pH 7.5-8.5条件下标准品的平均取代度计算结果均满足USP药典的系统适应性要求;pH 8.5条件下出峰更快,峰形更好;pH 8.0条件下标准品各峰(I-X)的相对迁移时间与USP药典参考值最接近,可以用于峰指认。

2. 实验部分

2.1 试剂和样品

背景电解质:30 mM的苯甲酸,加入100 mM的Tris缓冲液调整到合适的pH值;

标准溶液:取适量USP标准品,用去离子水配制成10 mg/mL磺丁基-β-环糊精标准溶液。

2.2 仪器及方法

仪器:SCIEX PA 800 Plus药物分析系统,匹配PDA检测器或UV检测器。熔融石英毛细管(PN. 338451):40/50 cm(有效/总长度),50 μm内径;毛细管温度:25 °C;样品室温度:25 °C;检测波长:间接紫外检测法200 nm;窗口狭缝:100×200 μm。分离条件:0-30 kV线性梯度10 min,然后30 kV维持20 min;进样条件:0.5 psi,10 s;

毛细管冲洗步骤:新的毛细管在首次使用前需要先用1 M的NaOH在20 psi压力下冲洗1 h,再用水在20 psi压力下冲洗2 h。每天分析样品前需先用0.1 M的NaOH在20 psi压力下冲洗30 min,水在20 psi压力下冲洗2 h,背景电解质溶液在20 psi压力下冲洗1 h。

样品分离的时间程序见表1。

表1. 样品分离的时间程序。

时间 Time	事件	值	持续 时间	进口盘	出口盘	概要	备注
	Rinse- Pressure	20 psi	2.00 min	BI:D1	BO:D1	Forward	0.1 N NaOH rinse
	Rinse- Pressure	20 psi	3.00 min	·BI:E1	BO:D1	Forward	Water rinse
	Rinse- Pressure	20 psi	3.00 min	BI:B1	BO:D1	Forward	Buffer rinse
	Inject- Pressure	0.5 psi	10 sec	SI:A1	BO:C1	Override, Forward	Sample injection
0.00	Separate- Voltage	30 kV	30.00 min	BI:C1	BI:C1	10.00 min ramp, normal polarity,both	
30.01	End						

3. 结果与讨论

美国药典方法未规定背景电解质的pH，本研究考察了pH 7.5, pH 8.0及pH 8.5三个不同pH下各峰(I-X)的分离结果是否满足系统适应性要求。

3.1 系统适应性要求结果分析

本研究用磺丁基-β-环糊精标准溶液考察了pH 7.5, pH 8.0及pH 8.5三个不同pH下各峰(I-X)的分离结果是否满足系统适应性要求。

不同pH值下标准品的电泳图谱如图1。从图谱上看，pH增加时出峰更快，峰形更好。

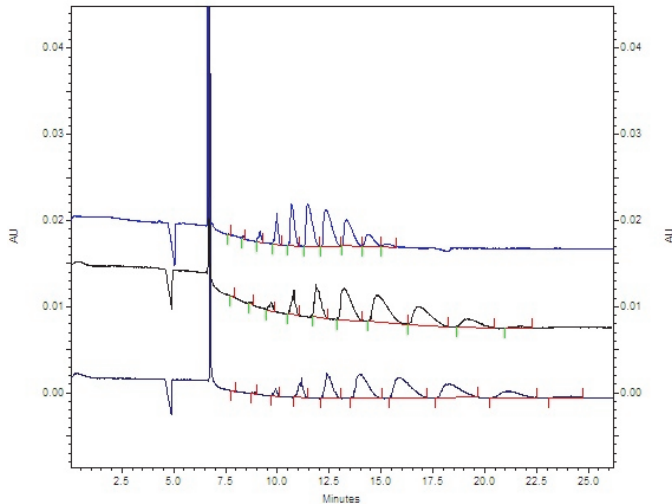


图1. 不同pH下标准品的电泳图谱。

对不同pH值下标准品各峰进行积分并计算平均取代度，计算方法如式1-3。

$$\text{校正峰面积 } A_i = \frac{\text{峰面积} \times \text{毛细管有效长度(cm)}}{\text{迁移时间}} \dots\dots(1)$$

$$\text{校正峰面积百分比 } A_i\% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100 \dots\dots(2)$$

$$\text{平均取代度} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{各峰的取代度} \times A_i\%)}{100} \dots\dots(3)$$

注：各峰的取代度为：峰I为1，峰II为2，……峰X为10。

结果表明，pH 7.5-8.0条件下标准品结果均满足USP药典系统

适应性要求。各峰(I-X)的峰面积百分比(Ai%)均在USP药典范围；峰IX和峰X的分离度均大于0.9满足USP药典要求；平均取代度结果也均能达到USP药典要求，结果见表2。

表2. 不同pH下标准品结果比较峰面积百分比，峰IX和峰X的分离度及平均取代度。

	USP限制范围	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
I	0-0.3	0.02	0.12	0.08
II	0-0.9	0.35	0.42	0.43
III	0.5-5.0	1.79	2.06	2.31
IV	2.0-10.0	5.64	6.12	6.58
V	10.0-20.0	12.86	13.44	14.67
VI	15.0-25.0	21.41	21.27	22.43
VII	20.0-30.0	24.59	25.54	25.19
VIII	10.0-25.0	20.60	19.15	18.56
IX	2.0-12.0	9.54	8.97	8.02
X	0-4.0	3.20	2.89	1.71
平均取代度	6.2-6.9	6.45	6.44	6.39
分离度(峰IX和峰X)	≥0.9	1.349	1.510	1.351

对比不同pH值下标准品各峰(I-X)的相对迁移时间，pH 8.0时各峰(I-X)的相对迁移时间更接近USP药典的参考值，可以用于磺丁基-β-环糊精各峰(I-X)的指认。结果见表3。

表3. 不同pH下各峰(I-X)相对迁移时间结果比较。

峰号	相对迁移时间			
	USP参考值	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5
I	0.58	0.50	0.57	0.62
II	0.63	0.56	0.63	0.67
III	0.69	0.63	0.69	0.75
IV	0.77	0.71	0.76	0.81
V	0.83	0.79	0.83	0.87
VI	0.91	0.88	0.91	0.93
VII	1.00	1.00	1.00	1.00
VIII	1.10	1.15	1.11	1.08
IX	1.20	1.33	1.23	1.17
X	1.30	1.52	1.34	1.24

重复性结果

本研究选择pH 8.0作为磺丁基-β-环糊精标准品的pH值进行重复性的考察。连续进样6针，计算各峰(I-X)迁移时间的重复性，结果如图2和表4。从表4中可以看出，各峰的迁移时间具有良好的重复性，迁移时间的RSD值为0.2%-3.14%。

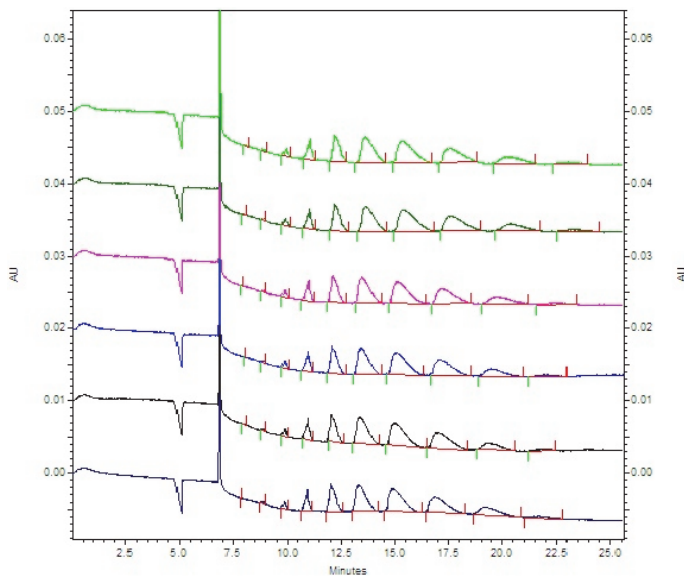


图2. pH 8.0下磺丁基-β-环糊精标准品各峰迁移时间的重复性(n=6)。

结论

本研究考察了不同背景电解质pH值对磺丁基-β-环糊精各峰(I-X)分离的影响，结果发现，pH从7.5到8.5变化时计算的平均取代度均能满足USP药典要求。pH 8.5时各峰出峰更快，峰形更好；pH 8.0时各峰的相对迁移时间更接近USP药典给出的参考值。

在分析实际样品时，可以先用pH 8.0进行试分离，再根据USP药典系统适应性要求各峰的出峰时间及峰形情况来调整至合适pH值，保证各峰相对迁移时间更接近USP药典参考值。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11944-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)

表4. pH 8.0下磺丁基-β-环糊精标准品各峰迁移时间的重复性(n=6)。

峰号	迁移时间(min, n=6)						RSD(%)
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	
I	7.85	7.917	8.008	7.846	7.921	7.933	0.76
II	8.808	8.821	8.829	8.829	8.846	8.858	0.20
III	9.875	9.887	9.9	9.904	9.917	9.946	0.25
IV	10.963	10.983	11.004	11.021	11.063	11.079	0.41
V	12.008	12.042	12.075	12.1	12.192	12.192	0.63
VI	13.342	13.375	13.433	13.496	13.65	13.629	0.96
VII	14.863	14.967	15.025	15.108	15.458	15.413	1.61
VIII	16.854	17.021	17.125	17.208	17.642	17.546	1.77
IX	19.212	19.375	19.454	19.667	20.425	20.433	2.72
X	21.7	21.9	21.967	22.775	23.429	23.029	3.14

参考文献

1. Betadex / Official Monographs, The United States Pharmacopeial Convention, 2012, 5425-5426.