

· 研究报告 ·

高效液相色谱法测定人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸的含量

高莉萍, 李萍, 姚佳佳 (上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱法测定人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸含量的方法。**方法** 采用 Shim-pack CLC-ODS 色谱柱,以丙氨酸为内标,2,4-二硝基氟苯(DNFB)为柱前衍生剂,50%乙腈溶液-0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(35:65)为流动相,检测波长为 360 nm。**结果** 甘氨酸在 0.006~0.030 mg/ml 浓度范围内线性关系良好($r=0.9993$),平均回收率为 101.4%,RSD 为 0.14% ($n=9$)。**结论** 该方法简单灵敏,结果准确可靠,可用于人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸含量的测定。

[关键词] 人凝血因子Ⅷ;甘氨酸;丙氨酸;高效液相色谱法;测定

[中图分类号] R927.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)01-0059-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.016

Determination of glycine in the pharmaceutical of human coagulation factor Ⅷ by HPLC

GAO Liping, LI Ping, YAO Jiajia (Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective** To establish the method for determination content of glycine in the pharmaceutical of human coagulation factor Ⅷ by HPLC. **Methods** The analysis was carried on a Shim-Pack CLC-ODS column with a mobile phase of 50% acetonitrile-0.05 mol/L sodium acetate buffer (35:65) at the detection wavelength of 360 nm, using alanine and 2,4-dinitrofluorobenzene as the internal standard and derivation agent, respectively. **Results** The method showed a good linearity in the range of 0.006-0.030 mg/ml ($r=0.9993$) for glycine. The average recovery was 101.4%, and the RSD was 0.14% ($n=9$). **Conclusion** This method was simple, sensitive, accurate, reliable, and suitable for determination of glycine in the pharmaceutical of human coagulation factor Ⅷ.

[Key words] human coagulation factor Ⅷ;glycine;alanine;HPLC;determination

人凝血因子Ⅷ是我公司研发的产品,临床上主要用于预防甲型血友病和获得性凝血因子Ⅷ缺乏所致的出血症及这类病人的手术出血治疗^[1-3]。本公司试制的人凝血因子Ⅷ制品中加入适量甘氨酸作为蛋白保护剂^[4],并且规定其含量在人凝血因子Ⅷ制品用 10 ml 注射用水复溶后浓度在 6~15 mg/ml 范围内,因此,须对其在制品中的含量进行检测和控制。

据报道,测定甘氨酸含量的方法有非水滴定法、甲醛法等。非水滴定法主要用于甘氨酸原料药中甘氨酸的含量测定,因人凝血因子Ⅷ制品成分较为复杂,存在干扰,所以不适合用此方法进行测定;甲醛法主要用于样品中只含有单一的已知氨基酸的测定,但人凝血因子Ⅷ是一种不稳定的蛋白,会造成测定结果偏高,因此这种方法也不能用于人凝血因子

Ⅷ中甘氨酸含量的测定,故笔者参考有关文献^[5,6],利用高效液相色谱法,采用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为柱前衍生剂,对人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸的含量测定方法进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 1260 液相色谱仪,包含四元泵、自动进样器、紫外检测器和柱温箱。

1.2 试剂 2,4-二硝基氟苯(DNFB,中国医药上海化学试剂公司,分析纯);碳酸氢钠(国药集团化学试剂公司,分析纯);丙氨酸(国药集团化学试剂公司,分析纯,含量不少于 99.0%),甘氨酸(国药集团化学试剂公司,分析纯,含量不少于 99.5%);乙腈(MERCK 公司,色谱纯);人凝血因子Ⅷ(批号:20131006N、20131008N、20141202N;规格:200 IU/瓶,本公司研究部提供)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

[基金项目] 上海市高新技术成果转化项目(201210593)

[作者简介] 高莉萍,本科,执业药师。Tel:(021)50931037;E-mail:liping-gao@163.com

2.1.1 对照品溶液 精密称取甘氨酸对照品 60 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 用注射用水定容, 得浓度为 0.6 mg/ml 的甘氨酸对照品溶液, 备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取丙氨酸 20 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 用注射用水定容, 得浓度为 0.2 mg/ml 的丙氨酸内标溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液 取一瓶待检人凝血因子Ⅷ供试品平衡至室温, 用 10 ml 注射用水溶解样品, 然后轻轻地混匀; 精密吸取复溶后样品 1.0 ml, 用 4.0 ml 1.5% 磺基水杨酸沉淀蛋白质, 放置 2 h 后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1.0 ml, 置 10 ml 容量瓶中, 用生理盐水稀释至刻度, 混匀, 备用。

2.1.4 空白对照溶液 精密吸取按处方配制的不含甘氨酸的人凝血因子Ⅷ样品溶液 1.0 ml, 照供试品溶液的制备方法制得。

2.2 衍生化反应 精密量取适量体积的甘氨酸对照品溶液或供试品溶液 1.0 ml 与内标溶液 0.5 ml 于 10 ml 容量瓶中, 加入 0.5 mol/L 碳酸氢钠 (pH 9.0) 溶液 1.0 ml, 摇匀, 再加入 1% DNFB 衍生溶液 0.1 ml, 混匀, 避光, 于 60 °C 恒温水浴中衍生 1 h, 取出, 放置冷却。加入磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)

定容, 摇匀, 放置 15 min 后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取过滤液进样。

2.3 色谱条件 色谱柱 Shim-pack CLC-ODS (6.0 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 50% 乙腈溶液-0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液 (35 : 65); 检测波长: 360 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.4 专属性试验 精密吸取按“2.1.4”项下方法制备的空白对照溶液 1.0 ml 置 10 ml 容量瓶中, 不加丙氨酸内标溶液, 按“2.2”项下方法进行衍生化, 并按“2.3”色谱条件操作, 记录色谱图; 另外精密吸取按“2.1”项下方法制备的对照品溶液 0.4 ml、供试品溶液 1.0 ml 与内标溶液 0.5 ml 分别置 10 ml 容量瓶中, 按上述方法操作, 记录色谱图。从图 1 (A) 可知, 图谱中只有衍生化试剂 (DNFB) 色谱峰, 保留时间约为 10.01 min, 说明处方中其他成分对甘氨酸含量测定无干扰; 从图 1 (B) 可知, 甘氨酸衍生物峰与丙氨酸衍生物峰完全分离, 保留时间分别为 12.64 min 和 19.46 min; 从图 1 (C) 可知, 甘氨酸衍生物峰与丙氨酸衍生物峰、其他杂质峰完全分离, 分离度均大于 1.5, 互不干扰, 专属性好。

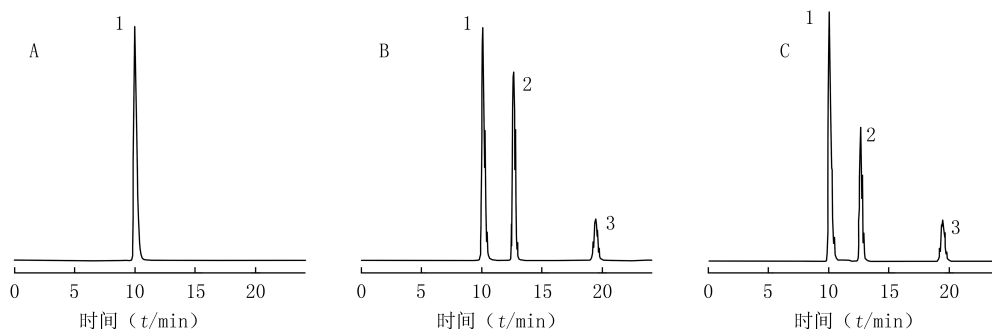


图 1 HPLC 色谱图

A. 空白对照溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. DNFB; 2. 甘氨酸衍生物; 3. 丙氨酸衍生物

2.5 线性关系考察 精密吸取按“2.1”项下方法配制的甘氨酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 与内标溶液 0.5 ml, 分别置 10 ml 容量瓶中, 按“2.2”项下方法进行衍生化, 并按“2.3”色谱条件操作, 记录色谱图。以甘氨酸浓度 X (mg/ml) 对甘氨酸衍生物峰面积与丙氨酸衍生物峰面积比 Y 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y = 1.4264 \times 10^2 X - 0.2463$, $r = 0.9993$ 。结果表明甘氨酸浓度在 0.006~0.030 mg/ml 范围内与峰面积比呈良好线性关系。

2.6 加样回收率试验 精密称取甘氨酸对照品 82.1、103.3、119.0 mg 分别置 10 ml 容量瓶中, 加入不含甘氨酸的人凝血因子Ⅷ溶液并定容至刻度,

配制成 8.21、10.33、11.90 mg/ml 的溶液, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液后, 取 1.0 ml 按“2.2”项下方法进行衍生化, 并按“2.3”色谱条件操作, 记录色谱图。结果见表 1。

2.7 精密度试验 精密吸取按“2.1”项下方法配制的甘氨酸对照品溶液 0.5 ml 与内标溶液 0.5 ml 置 10 ml 容量瓶中, 按“2.2”项下方法进行衍生化, 并按“2.3”色谱条件检测, 连续测定 5 次, 计算得其峰面积比的 RSD 为 0.07%, 表明精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取按“2.1”项下方法配制的供试品溶液 1.0 ml (批号 20131006N) 与内标溶液 0.5 ml 置 10 ml 容量瓶中, 按“2.2”项下方法进行衍生化, 分别于 0、4、8、13 h 按“2.3”色谱条件检

表1 加样回收率试验结果(n=9)

甘氨酸理论浓度(mg/ml)	甘氨酸测得浓度(mg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
8.21	8.27	100.7		
8.21	8.27	100.7		
8.21	8.28	100.9		
10.33	10.52	101.8		
10.33	10.48	101.5	101.4	0.14
10.33	10.51	101.7		
11.90	12.12	101.8		
11.90	12.08	101.5		
11.90	12.11	101.8		

测。结果,甘氨酸衍生物峰面积与丙氨酸衍生物峰面积比分别为2.290 1、2.294 1、2.290 2、2.288 5, RSD为0.06%,表明衍生化样品在13 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批(批号为20141202N)样品6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下方法进行衍生化,并按“2.3”色谱条件检测。结果制品中甘氨酸平均含量为8.66 mg/ml, RSD为1.76%(n=6),表明方法重复性良好。

2.10 样品含量测定 精密吸取按“2.1”项下方法制备的供试品溶液1.0 ml(批号20131006N、20131008N、20141202N),按“2.2”项下方法进行衍生化,并按“2.3”色谱条件检测。结果见表2。

表2 样品中甘氨酸含量测定结果(n=3)

批号	含量(mg/ml)	RSD(%)
20131006N	8.89	0.1
20131008N	8.56	1.6
20141202N	8.60	0.5

3 讨论

3.1 本实验采用丙氨酸为内标是因为它与甘氨酸

差一个基团-CH₂-,接近于同质,分离度大于1.5,互不干扰;空白人凝血因子Ⅷ样品色谱图在甘氨酸和丙氨酸衍生物峰位置处无相应峰出现,说明处方中其他成分对测定无干扰。

3.2 本实验采用碘基水杨酸为蛋白质沉淀剂,2,4-二硝基氟苯为柱前衍生剂,衍生化反应为氨基酸在碱性条件下定量地与过量的DNFB迅速缩合生成二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸),该衍生化后产物可采用紫外检测器检测。

3.3 本实验仪器配置要求不高,普通的带紫外检测器的高效液相设备即可进行,同时衍生化试剂用量少,成本低,易于购买。

3.4 本实验操作简单、方法灵敏,测定结果准确可靠,可用于人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸的含量测定。

【参考文献】

- [1] Schwarzinger I, Pabinger I, Kominger C, et al. Incidence of inhibitors in patients with severe and moderate hemophilia A treated with factor Ⅷ concentrates[J]. Am J Hematol, 2006, 24(3):241-245.
- [2] Van DK, Van Der Bom JG, Lenting PJ, et al. Factor Ⅷ half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A [J]. Haematologica, 2005, 90(4):494-498.
- [3] 赵艳华, 马平, 卜凤荣. 凝血因子分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 1999, 10(2):158-160.
- [4] 孙东坡, 胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂及其保护机制[J]. 药学进展, 2003, 27(4):202-205.
- [5] 李瑜, 江勇, 李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液中L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34(3):32-34.
- [6] 尉小平, 冉铁成, 王坚, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定冻干人纤维蛋白原制品中盐酸精氨酸和甘氨酸的含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8):609-611.

[收稿日期] 2015-06-20 [修回日期] 2015-10-30

[责任编辑] 顾文华

(上接第31页)

- [5] 文彬, 黄秋凌, 龚艳青, 等. 左金丸及其主要单体成分对大肠癌的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19):1936-1941.
- [6] 张涛, 黄会云, 张志明, 等. DMH/DSS复合诱导小鼠溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7):1744-1746.
- [7] 王冬飞, 沈晓伶, 王建国. 二甲胍和葡聚糖硫酸钠建立溃疡性结肠炎相关性大肠癌小鼠模型[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,

2006, 15(5):511-515.

- [8] 王水红, 马应杰. 大肠腺瘤性息肉临床病理特点及癌变相关因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(14):393-395.
- [9] 吴柯, 杨俊霞, 周岐新. 小檗碱对实验性大鼠结肠癌的防治作用与环氧化酶2关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20):2768-2773.

[收稿日期] 2015-01-29 [修回日期] 2015-07-25

[责任编辑] 顾文华