

· 研究报告 ·

用 HPLC 法测定人凝血酶制品中甘氨酸的含量

盛凤仙, 张幼捷(上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

[摘要] 目的 建立一种测定人凝血酶制品中甘氨酸含量的 HPLC 方法。方法 以 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为柱前衍生剂,采用 ODS-C₁₈ 色谱柱,流动相为 50% 乙腈溶液-0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(35:65),流速 1.0 ml/min,检测波长 360 nm。结果 甘氨酸的线性范围为 0.006~0.030 mg/ml($r=0.999\ 6$),平均回收率为 100.4%,RSD 为 0.44%($n=9$)。结论 该方法简便、准确、专属性好,可用于人凝血酶制品中甘氨酸的含量测定。

[关键词] 人凝血酶;甘氨酸;丙氨酸;高效液相色谱

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)01-0074-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201903048

Determination of glycine in human thrombin by HPLC

SHENG Fengxian, ZHANG Youjie(Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for glycine assay in the human thrombin. **Methods** The sample was derivatized with 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB). HPLC was performed on an ODS-C₁₈ column with 50% acetonitrile-0.05mol/L sodium acetate buffer (35:65) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min and detection wavelength at 360 nm. **Results** The linear range of glycine was 0.006-0.030 mg/ml ($r=0.999\ 6$). The average recovery was 100.4%, with RSD 0.44% ($n=9$). **Conclusion** This method is simple, accurate and specific. It is suitable for glycine assay in human thrombin.

[Key words] human thrombin; glycine; alanine; HPLC

人纤维蛋白黏合剂是上海新兴医药股份有限公司自主研发的新产品,是由人纤维蛋白原及其灭菌注射用水、人凝血酶及其灭菌氯化钙溶液 4 种成分组成,不含防腐剂和抗生素,具有止血、覆盖、黏合伤口等临床作用^[1-2]。其中主要成分人凝血酶是由健康人的血浆经离子交换凝胶法分离纯化,并经 S/D 法和纳米膜过滤二步灭活和去除病毒、分装后冻干制成。由于冻干过程是一个复杂的相变过程,在冻结、冻融、干燥和储存过程中存在着多种影响因素,而冻干保护剂是影响制品冻干效果的主要因素,甘氨酸在冻干过程中对制品赋型作用显著,并对制品复溶后的澄清度有一定改善作用,是一种理想的蛋白保护剂^[3-4]。公司在生产人血酶制品过程中加入适量甘氨酸作为蛋白保护剂,并且限定其含量为 10~30 mg/ml。为了更好地控制产品的质量,有必要建立一种甘氨酸的含量检测方法用于人凝血酶制品的监控。笔者参考有关文献^[5-8],选用 DNFB 为柱前衍生剂,利用高效液相色谱法^[7],对人凝血酶制品中甘氨酸的含量测定方法进行探讨。

[基金项目] 上海市高新技术成果转化项目(20020406)

[作者简介] 盛凤仙,本科,执业药师,研究方向:生物制药,Email: wlrsfx@163.com

1 仪器与试药

高效液相色谱仪:安捷伦 1260 高效液相色谱仪;DNFB(中国医药上海化学试剂公司,分析纯);甘氨酸对照品(国药集团化学试剂公司,分析纯,含量 $\geq 99.5\%$)^[7];丙氨酸对照品(国药集团化学试剂公司,分析纯,含量 $\geq 99.0\%$)^[8];乙腈(默克公司,色谱纯);人凝血酶(上海新兴医药股份有限公司,批号:20150401T、20150402T、20150403T、20150504T;规格:1 000 IU/瓶)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 甘氨酸对照品溶液

精密称取甘氨酸对照品约 60 mg,置 100 ml 容量瓶中,用纯化水定容,得浓度为 0.6 mg/ml 的甘氨酸对照品溶液^[7],等待衍生化处理。

2.1.2 供试品溶液

取一瓶待检人凝血酶供试品,放置于室温,用配套 2 ml(40 mmol/L)氯化钙溶液溶解,然后轻轻摇动直至完全溶解;精密量取复溶后样品 1.0 ml 于试管中,加入 4 ml 1.5% 碘基水杨酸,混匀,离心,精

精密量取上清液 0.5 ml, 置 10 ml 容量瓶中, 用纯化水定容, 混匀后等待衍生化处理。

2.1.3 阴性对照溶液

精密量取无甘氨酸的人凝血酶样品溶液 1.0 ml, 按“2.1.2”项下供试品溶液制备方法操作, 即得阴性对照溶液, 等待衍生化处理。

2.1.4 内标溶液

精密称取丙氨酸约 20 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 用纯化水定容, 得浓度为 0.2 mg/ml 的丙氨酸内标溶液, 备用^[7]。

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 置 10 ml 容量瓶中, 加 0.5 ml 内标溶液, 再加 0.5 mol/L 碳酸氢钠 (pH9.0) 溶液 1 ml, 1% DNFB 乙腈溶液 0.1 ml, 混匀, 避光, 置 60 °C 恒温水浴中保温 1 h 后, 取出放冷, 用磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 定容^[7], 经 0.22 μm 水溶性膜过滤^[8], 滤液备用。

2.3 色谱条件

色谱柱: 岛津公司 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,); 流速 1.0 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长 360 nm; 进样量 20 μl^[7]。

2.4 专属性试验和系统适用性试验

精密量取上述制备的阴性对照溶液 1.0 ml 置 10 ml 容量瓶中, 不加内标溶液, 另外精密量取按“2.1.1”项下方法制备的对照品溶液 0.4 ml、按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 1.0 ml, 分别置 10 ml 容量瓶中, 加 0.5 ml 内标溶液, 按“2.2”项下方法进行衍生化反应, 并按“2.3”项下方法进行色谱条件测定, 记录色谱峰。结果在阴性对照溶液色谱图 1A 中仅有衍生化试剂 DNFB 色谱峰-1^[7]; 在甘氨酸对照品溶液色谱图 1B 和供试品溶液色谱图 1C 中, 均有衍生化试剂 DNFB 色谱峰-1 (保留时间约为 9.9 min)、甘氨酸衍生物峰-2 (保留时间约为 12.6 min) 和丙氨酸衍生物峰-3 (保留时间约为 19.3 min) 3 个峰, 并且各峰之间完全分离, 互不干扰^[7]; 在图 1B 中, 甘氨酸衍生物与相邻两色谱峰的分度分别为 6.2 和 12.9, 甘氨酸衍生物的拖尾因子为 1.11, 丙氨酸衍生物的拖尾因子为 1.14, 均符合《中国药典》要求, 见图 1。

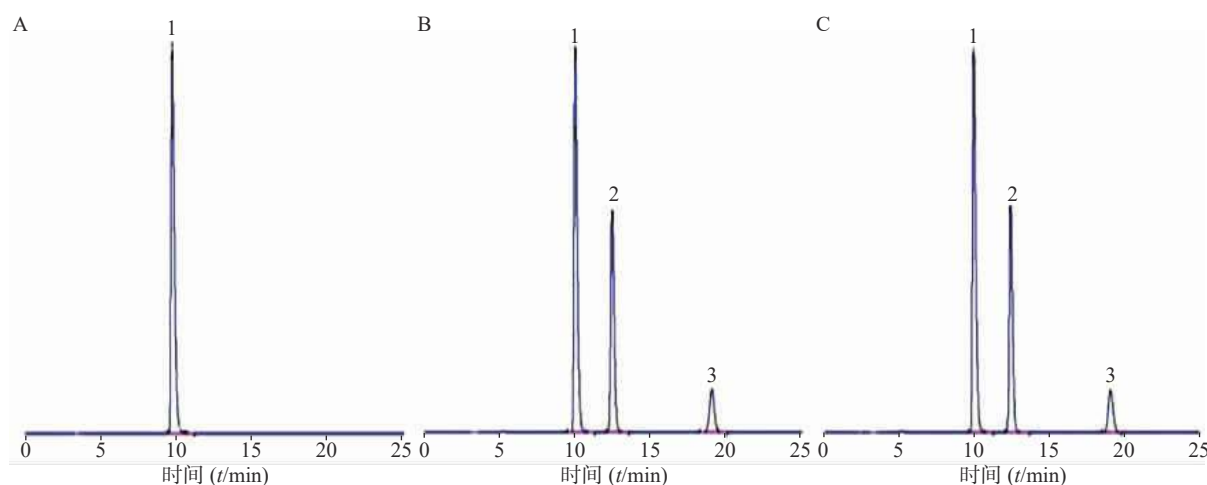


图 1 甘氨酸含量测定 HPLC 图

A 阴性对照溶液; B.甘氨酸对照品溶液; 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

分别精密量取上述制备的甘氨酸对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 ml 置 10 ml 容量瓶中, 按“2.2”项下方法进行衍生化反应, 并按“2.3”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以甘氨酸浓度 (X, mg/ml) 对甘氨酸衍生物峰面积与内标丙氨酸衍生物峰面积之比 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=156.794 0X-0.127 2$, $r=0.999 6$ 。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^[7]。

2.6 回收率试验

精密称取 0.381 9、0.382 3、0.382 3、0.483 8、0.483 0、0.484 4、0.594 4、0.593 6、0.594 1 g 甘氨酸对照品, 分别置 20 ml 容量瓶中, 用无甘氨酸的人凝血酶样品溶液定容, 配制成 19.10、19.12、19.12、24.19、24.15、24.22、29.72、29.68 和 29.71 mg/ml 的甘氨酸对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下方法进行衍生化反应, 并按“2.3”项下色谱条件测定, 记录峰面积。结果平均回收率为 100.4%, 平均 RSD 为 0.44%, 符合要求, 详见表 1。

表1 人凝血酶回收率试验结果 (n=9)

理论浓度 (mg/ml)	测得浓度 (mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
19.10	19.24	100.7	100.4	0.44
19.12	19.24	100.6		
19.12	19.24	100.6		
24.19	24.39	100.8		
24.15	24.40	101.0		
24.22	24.36	100.6		
29.72	29.70	99.9		
29.68	29.65	99.9		
29.71	29.66	99.8		

注:线性回归方程为 $Y=161.453 2X-0.163 7$, $r=0.999 6$

2.7 精密度试验

精密量取上述制备的甘氨酸对照品溶液 0.5 ml 置 10 ml 容量瓶中,按“2.2”项下方法进行衍生化反应,并按“2.3”项下色谱条件测定,重复进样 5 次,记录峰面积。结果甘氨酸衍生物与丙氨酸衍生物峰面积比的 RSD 为 0.19%,表明精密度良好^[7]。

2.8 稳定性试验

精密量取按“2.1.2”项下方法配制的供试品溶液 1.0 ml(批号:20150504T)置 10 ml 容量瓶中,按“2.2”项下方法进行衍生化反应,分别于 0、4、12、13 h 按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。结果显示,甘氨酸衍生物与丙氨酸衍生物峰面积比分别为 3.960 3、3.960 9、3.961 0、3.961 0, RSD 为 0.01%,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:20150504T)样品 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下方法进行衍生化反应,并按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。结果制品中甘氨酸含量分别为 26.68、26.66、26.66、26.65、26.66、26.64 mg/ml,平均含量为 26.66 mg/ml, RSD 为 0.05%(n=6),表明方法重复性良好^[7]。

2.10 样品含量测定

精密量取按“2.1.2”项下方法制备的供试品溶液 1.0 ml(批号:20150401T、20150402T、20150403T),按“2.2”项下方法进行衍生化反应,并按“2.3”项下色谱条件测定,记录峰面积。结果符合要求,见表 2。

表2 样品中甘氨酸含量测定结果 (n=2)

批号	甘氨酸衍生物对丙氨酸衍生物峰面积比	甘氨酸含量 (mg/ml)
20150401T	3.5682	23.57
20150402T	3.7018	24.42
20150403T	3.6896	24.34

3 讨论

3.1 系统适用性试验符合要求

本实验条件下,在阴性对照溶液色谱图中仅有衍生剂 DNFB 色谱峰,无其他杂质峰,无干扰,专属性好;在对照品溶液的典型图谱中,甘氨酸衍生物与相邻两峰完全分离,分离度均大于 1.5,甘氨酸和丙氨酸拖尾因子均在 0.95~1.40 范围内,符合《中国药典》要求。

3.2 实验原理

本实验采用的蛋白质沉淀剂为磺基水杨酸, DNFB 为柱前衍生剂,在碱性条件下氨基酸与 DNFB 迅速缩合生成二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸)^[7],该衍生化产物在紫外 360 nm 处有较强的吸收,且较稳定,不易分解,能满足 HPLC 法分离和检测的要求^[8]。

3.3 本法特点

本实验仪器配置要求不高,且操作简便、结果准确,可用于人凝血酶制品中甘氨酸的含量测定。

【参考文献】

- [1] 薛毅,王庆才,徐俊,等.纤维蛋白胶对实验性肝损伤的止血效果观察[J].中华实验外科杂志,1996,13(3):151-152.
- [2] 薛毅,王庆才.纤维蛋白胶在实验性皮肤损伤愈合中的作用[J].中华实验外科杂志,1997,14(4):255.
- [3] 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):201-205.
- [4] 朱敖兰,杨洁,ZHU A L,等.生物制品冻干保护剂及其保护机理的研究进展[J].喀什师范学院学报,2007,28(6):46-50.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)2015年版[S].北京:中国医药科技出版社,2015:235-236.
- [6] 丁建,王玲娜,苏丹.RP-HPLC法测定眼氨肽滴眼液中6种氨基酸的含量[J].江苏药学与临床研究,2004,12(5):29-32.
- [7] 高莉萍,李萍,姚佳佳,等.高效液相色谱法测定人凝血因子Ⅷ制品中甘氨酸的含量[J].药学实践杂志,2016,34(1):59-61.
- [8] 姚佳佳,闫晨.柱前衍生化法同时测定人凝血因子Ⅷ中甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量[J].药学实践杂志,2018,36(4):362-364.

[收稿日期] 2019-03-12 [修回日期] 2019-05-13

[本文编辑] 李睿旻