

柱后衍生 HPLC 法测定血液制品中甘氨酸的含量

张彤^{1*}, 武晗燕¹, 张伟¹, 韩南银^{2#} (1.北京市药品检验所, 北京 100035; 2.北京大学医学部, 北京 100091)

中图分类号 R927.2; R977.4; R977.8 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2377-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.27

摘要 目的: 建立测定血液制品中甘氨酸含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。以邻苯二甲醛(OPA)为柱后衍生剂, 测定4种血液制品中的氨基酸与衍生剂衍生后所得衍生生产物的含量, 并与2010年版《中国药典》标准方法(柱前衍生法)比较。色谱柱为 Thermo C₁₈, 流动相为柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 60 °C, 检测波长为 336 nm, 内标(正缬氨酸)法定量。结果: 甘氨酸检测质量浓度线性范围为 2~200 mg/L ($r=0.999\ 9$), 4种血液制品中甘氨酸的平均回收率分别为 99.6%、98.5%、100.2%、98.6%, RSD 分别为 2.5%、0.3%、1.6%、2.2%, 定量限为 20 ng。该法与标准方法测定含量结果基本一致。结论: 该方法灵敏度高, 结果准确可靠。

关键词 高效液相色谱法; 柱后衍生法; 血液制品; 甘氨酸; 邻苯二甲醛; 含量测定

Content Determination of Glycine in the Blood Products by HPLC with Post-column Derivatization

ZHANG Tong¹, WU Han-yan¹, ZHANG Wei¹, HAN Nan-yin² (1.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China; 2.Peking University Health Science Center, Beijing 100091, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of glycine in the blood products. METHODS: Using *O*-phthalaldehyde (OPA) as post-column derivating agent, the derivant content of derivating agent and amino acid of 4 blood products were determined by HPLC. It was compared with the pre-column derivatization stated in *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). The determination was performed on Thermo C₁₈ column with mobile phase composed of sodium citrate buffer (pH=4.0) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 60 °C and detection wavelength was 336 nm. The quantitative method was carried out by internal standard (norvaline). RESULTS: The linear range of glycine was 2-200 mg/L ($r=0.999\ 9$), and the recovery rates of 4 blood products were 99.6% (RSD=2.5%), 98.5% (RSD=0.3%), 100.2% (RSD=1.6%), 98.6% (RSD=2.2%). The limit of quantitation was 20 ng. The method was found to be basically in line with standard method. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and reliable.

KEY WORDS HPLC; Post-column derivatization; Blood products; Glycine; *O*-phthalaldehyde; Content determination

血液制品是在临床输血的基础上发展起来的一种药品, 其通过将血浆中的有效成分分离出来并用于治疗。2010年版《中国药典》(三部)中对血液制品的定义是^[1]: 由健康人血浆或经特异性免疫的人血浆, 经分离、提纯或由重组DNA技术制成的血浆蛋白组分, 以及血液细胞有形成分统称为血液制品, 如人血白蛋白、人免疫球蛋白、特异性免疫球蛋白、人凝血因子(天然或重组的), 用于治疗 and 被动免疫预防。血液制品

试验环境等各种因素的影响, 试验的结果会有所不同, 因此需要做干扰试验以排除各种因素的影响。在进行预干扰试验时, 单用BET水溶解、稀释会产生干扰, 而先用专用溶剂溶解后再用BET水稀释到 2.5 mg/ml 或以下时则无干扰。究其原因, 丁二磺酸腺苷蛋氨酸为酸性物质, 用BET水溶解后测得pH值约为 3, 对鲎试剂和内毒素可产生干扰抑制作用^[1]; 丁二磺酸腺苷蛋氨酸专用溶剂的主要成分为氢氧化钠, 溶解后的pH值约为 7, 对丁二磺酸腺苷蛋氨酸的pH值进行调节, 由此较好地排除了干扰^[1]。本试验采用 2 个不同厂家的鲎试剂($\lambda =$

* 副主任药师。研究方向: 药物分析。电话: 010-83222411。E-mail: zhangtong74@gmail.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 010-82801590。E-mail: nanyin.han@pku.edu.cn

的生产工艺从盐析法、利凡诺法发展到目前大多数企业采用的低温乙醇法或N-K(Nitschmann-Kistler)法^[2]。根据生产工艺和产品的稳定性等特性, 除人血白蛋白外, 多数血液制品如凝血因子类、人免疫球蛋白和特异性免疫球蛋白会添加一定量的氨基酸和/或糖类作为稳定剂。不同企业根据不同产品选择不同氨基酸作为稳定剂, 一般包括甘氨酸、精氨酸、盐酸赖氨酸和组氨酸, 其中最常使用的是甘氨酸。甘氨酸作为目前药

0.25 EU/ml) 对 3 个批号的样品进行试验, 将样品稀释至 2.5 mg/ml 及以下时, 不干扰细菌内毒素检查。因此, 注射用丁二磺酸腺苷蛋氨酸用凝胶法进行细菌内毒素检查是可行的。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 99-102、212-213.
- [2] 吴寒寅, 孟德胜. 多种微量元素注射剂(II)细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药房, 2011, 22(5): 440.
- [3] 王贵英. 英解磷定注射液细菌内毒素检查法的建立[J]. 中国药房, 2011, 22(45): 4 287.

(收稿日期: 2012-09-03 修回日期: 2012-11-10)

物制剂中较为常用的助溶剂和稳定剂,其质量状况对于相关药品的安全性、有效性具有一定影响,因此应予以控制。2010年版《中国药典》(三部)附录中收录了人免疫球蛋白中甘氨酸含量测定法^[1],该方法依据过量的6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基基甲酸酯(AQC)在一定条件下与氨基酸形成稳定的衍生产物(柱前衍生),用高效液相色谱(HPLC)法测定衍生产物的含量,从而间接测定甘氨酸含量。该方法引入了过多的物质,如衍生剂和衍生副产物,其对柱子有潜在的负面影响;另外采用手工衍生也会引入过多的影响因素。为此,笔者建立了柱后衍生法,即采用邻苯二甲醛(OPA)柱后衍生技术,将氨基酸在分析柱中实现分离后,在衍生装置中与衍生剂自动在线衍生,再测定衍生产物的含量。笔者采用建立的方法对4种血液制品中的甘氨酸含量进行了测定,并与柱前衍生法结果进行比较。结果表明,本方法操作简便,灵敏度高,重现性好,耐用性好,结果满意。

1 材料

20AT型HPLC仪,包括LC-20AT泵、SPD-M20A二极管阵列检测器、LC-Solution色谱工作站(日本岛津公司);柱后衍生装置(美国Pickering公司);2-6型离心机(美国Sigma公司)。

甘氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140689-2011103,纯度:100.0%);正缬氨酸对照品(美国Agilent公司,批号:442711/1,纯度:100%);狂犬病人免疫球蛋白(批号:201111003、201111004、201102001)、乙型肝炎人免疫球蛋白(批号:201203002、201203003、201203004)、破伤风人免疫球蛋白(批号:201002005、201106001、201110002)、人免疫球蛋白(批号:201109002、201111003、201009001)均为华兰生物工程股份有限公司市售品,规格均为每支200 IU,甘氨酸含量均为10~30 g/L;OPA(美国Sigma公司);水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:柠檬酸钠缓冲液(取柠檬酸钠8.82 g、无水硫酸钠4.26 g和正丙醇150 ml,溶于约2 700 ml水中,用硫酸调节pH至4.0,加入十二烷基硫酸钠17.3 g,加水至3 000 ml),流速:1.0 ml/min;柱温:60 ℃;检测波长:336 nm。

检测方法为柱后衍生法,用一带控温箱的柱后衍生反应器,衍生试剂为OPA试液(取氢氧化钠24 g、硼酸43.2 g溶于约2 700 ml水中,用硫酸调节pH至4.0,加入2-巯基乙醇2 ml和8%的OPA乙醇溶液15 ml,加水至3 000 ml)。衍生温度:60 ℃;反应管:聚四氟乙烯管,内径:1 mm,长度:约50 cm;衍生试剂流速:0.8 ml/min;进样量:10 μl。理论板数按甘氨酸峰计算不低于2 000;甘氨酸与内标色谱峰之间分离度应大于2.0,拖尾因子(T)为0.95~1.40。

2.2 溶液的制备

2.2.1 内标溶液的制备。准确称取正缬氨酸对照品适量,加水溶解并稀释制成每1 ml中约含2 mg的溶液,作为内标溶液。

2.2.2 对照品贮备溶液的制备。准确称取经105 ℃干燥至恒重的甘氨酸对照品适量,加水溶解并稀释制成每1 ml中约含2 mg的甘氨酸对照品贮备溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备。精密量取供试品1.0 ml,加1.5%碘基水杨酸溶液9.0 ml,混匀静置2 h,以3 000 r/min离心10

min,留取上清液备用。

2.2.4 空白辅料溶液的制备。按照处方比例称取辅料(氯化钠、葡萄糖、聚山梨酯80)适量,加到产品半成品中,摇匀,作为空白辅料溶液。

2.3 衍生条件及方法学考察

2.3.1 衍生方法的选择。伯胺类化合物有多种衍生剂可供选择,其中比较常用的有2,4-二硝基氟苯、异硫氰酸苯酯、AQC、OPA和9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)。考虑衍生剂的毒性和易获得性的因素后,本试验采用OPA作为衍生剂,并根据OPA衍生剂所适用的反应条件配制OPA试液。

2.3.2 衍生条件的考察。本试验对衍生温度、衍生时间(反应管长度及衍生剂流速)及衍生剂用量进行了考察。结果表明,衍生温度、衍生时间及衍生剂用量对甘氨酸的测定均有影响。当衍生温度为60 ℃,反应管长度为50 cm,衍生剂流速为0.8 ml/min,OPA质量浓度为0.4 mg/ml时,甘氨酸衍生物的峰面积不再增加,从而可准确测定甘氨酸含量,以此确定衍生条件。

2.3.3 检测波长的确定。本试验采用二极管阵列检测器,所以可以方便地得到供试品的紫外图谱。以水或0.01 mol/L盐酸作为溶剂,结果均在336 nm波长处有最大吸收,并且空白辅料溶液在此波长下无紫外吸收,因此确定336 nm为本试验的检测波长。

2.3.4 线性关系考察。精密量取“2.2.2”项下的甘氨酸对照品贮备溶液10、5、2.5、1.0、0.5、0.25、0.1 ml,分别置于100 ml量瓶中,精密加入“2.2.1”项下内标溶液2.5 ml,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,进样。以质量浓度(x)对主峰面积与内标峰面积的比值(y)进行回归,分析得回归方程: $y=0.03061x+0.02587$ ($r=0.9999$, $n=7$)。表明甘氨酸检测质量浓度线性范围为2~200 mg/L。

2.3.5 定量限试验。根据测试溶液浓度和进样体积计算,信噪比为10时甘氨酸定量限为20 ng。

2.3.6 精密度试验。取质量浓度为50 mg/L的对照品溶液,连续进样6次,其主峰面积与内标峰面积的RSD为0.10%。

2.3.7 稳定性试验。取同一供试品溶液,在0、1、2、3、24、30 h分别进样,结果RSD为0.5%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置30 h内稳定。

2.3.8 回收率试验。分别精密称取甘氨酸对照品约250 mg,置于25 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取上述溶液各1 ml,分别置于10 ml量瓶中,精密加入供试品0.3、0.5、0.7 ml各3份,加1.5%碘基水杨酸溶液稀释并定容至刻度;混匀静置2 h,以3 000 r/min离心10 min,精密量取上清液2.5 ml,分别置于100 ml量瓶中,精密加入“2.2.1”项下内标溶液2.5 ml,用水稀释至刻度,摇匀,进样,计算,结果见表1。

2.3.9 耐用性试验。取同一批样品,采用不同厂牌3种色谱柱(Thermo Hypersil GOLD、Welch Materials、Kromasil)测定,评价系统适用性相关指标。结果甘氨酸峰理论板数均大于2 000,主峰与内标峰的分离度均大于2.0,表明本方法耐用性好。

2.3.10 样品含量测定。精密量取按“2.2”项下方法制备的供试品溶液、对照品贮备溶液各2.5 ml,分别置于100 ml量瓶中,精密加入内标溶液2.5 ml,加水稀释至刻度,摇匀,进样测定,按内标法以峰面积计算,并与2010年版《中国药典》方法(柱前衍生法)进行比较。将结果进行统计学双样本方差分析,F检验由于统计值 $F=4.13<$ 临界值6.26,表明两者精密度无显著

表1 4种血液制品中甘氨酸的回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery test of glycine in 4 blood products (n=9)

指标	狂犬病人免疫球蛋白 (批号:201111003)	乙型肝炎免疫球蛋白 (批号:201203002)	破伤风人免疫球蛋白 (批号:201110002)	人免疫球蛋白 (批号:201111003)
回收率, %	98.3	98.2	98.2	96.9
	97.8	98.3	98.4	96.1
	97.9	98.1	98.6	95.8
	102.8	98.7	102.9	101.7
	103.0	98.8	100.6	100.2
	102.4	98.9	101.6	101.2
	100.2	98.5	101.2	98.4
	96.1	98.4	100.8	98.8
	98.4	98.7	99.9	98.7
平均回收率, %	99.6	98.5	100.2	98.6
RSD, %	2.5	0.3	1.6	2.2

性差异; *t* 检验(双样本等方差假设) $P=0.076 < \text{临界值} 1.83$, 表明平均值无显著性差异, 结果详见表2, 色谱图见图1。

表2 4种血液制品中甘氨酸含量测定结果(g/L)

Tab 2 Results of content determination of glycine in 4 blood products(g/L)

名称	批号	本方法	《中国药典》法
狂犬病人免疫球蛋白	201111003	25.88	27.15
	201111004	26.28	26.27
	201102001	24.80	25.47
乙型肝炎免疫球蛋白	201203002	26.22	24.06
	201203003	24.09	22.50
	201203004	23.93	23.66
破伤风人免疫球蛋白	201002005	26.50	-
	201106001	27.90	27.95
	201110002	25.99	27.01
人免疫球蛋白	201109002	25.64	26.60
	201111003	22.99	22.62
	201009001	23.68	-
	均值	25.32	25.33

注:“-”表示由于样品量不足, 未与《中国药典》方法进行比较

note:“-” means the method can not compared with that stated in

Chinese Pharmacopeia because of insufficient sample

3 讨论

柱后衍生法测定氨基酸主要依靠氨基酸自身的特性进行分离, 通常选用离子色谱柱或在流动相中加入适量表面活性剂。本文选用柠檬酸盐水溶液-正丙醇二元体系, 加入适量表面活性剂十二烷基硫酸钠来达到良好的分离效果。

氨基酸含量测定的方法文献^[3-8]报道很多, 其中包括非水滴定法和定氮法, 也有一些使用不同衍生剂的柱前衍生的HPLC法, 还有采用氨基酸自动分析仪和离子色谱仪测定。其中经典的非水滴定法和定氮法专属性较差, 主要适用于纯度很高的氨基酸原料药的含量测定; 而氨基酸自动分析仪和离子色谱仪的使用并不普及, 试验成本高; HPLC法是专属性强且灵敏度高的方法。已有文献报道的衍生法多为柱前衍生法, 未见柱后衍生测定血液制品中氨基酸的相关报道。本试验采用柱后衍生法, 以自动在线衍生^[9]的方式, 与柱前衍生法比较, 节约了衍生反应时间(柱前法手动衍生约5 min, 记录色谱图32 min; 柱后自动在线衍生时间约30 s, 记录色谱图8

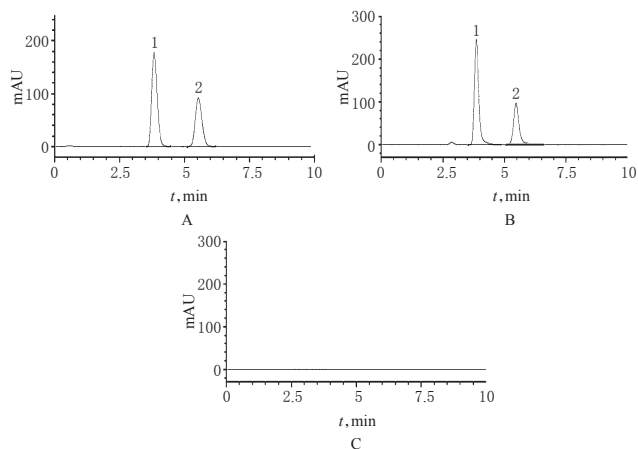


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 样品(批号:201203002); C. 空白辅料; 1. 甘氨酸; 2. 内标

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. samples (lot No. 201203002); C. blank excipients; 1. glycine; 2. internal standard

min), 缩短了试验周期。由于衍生剂不通过色谱柱, 所以同时也保护了色谱柱, 延长了色谱柱的使用寿命。

本方法也有一定的局限性: 通过在样品中直接加入OPA试液, 并在一定的间隔时间内测定其紫外吸光度, 笔者发现吸光度值会明显下降。这是由于OPA与氨基酸衍生后得到的是不太稳定的化合物, 所以操作中要保证每份样品的衍生时间一致。本试验采用自动在线衍生的方式, 保证了每份样品衍生时间相同, 因此能够获得满意的结果。

综上所述, 本方法操作简便、快速、专属性强、灵敏度高、重复性好、结果准确, 与《中国药典》方法比较能够更好地控制产品的质量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录41.
- [2] 洪好武. 血液制品安全及质量控制[J]. 中国医药导刊, 1998, 10(8): 1286.
- [3] 于泓, 牟世芬. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. 分析化学, 2005, 33(3): 398.
- [4] 瞿其曙, 汤晓庆, 胡效亚, 等. 柱前衍生法在氨基酸分析测定中的应用[J]. 化学进展, 2006, 18(6): 789.
- [5] 常碧影, 梁冬生, 阎惠文, 等. 氨基酸分析技术的研究与现状[J]. 氨基酸杂志, 1992(2): 29.
- [6] 朱曙东, 赵昇皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1994, 12(1): 20.
- [7] 常碧影, 杨文军. 氨基酸分析与仪器性能评论[J]. 现代科学仪器, 2004(6): 6.
- [8] 刘慧文. 柱前和柱后高效液相色谱分析氨基酸方法进展与评述[J]. 氨基酸和生物资源, 1995, 17(2): 50.
- [9] 张彤, 山广志, 余立. 柱后衍生HPLC法测定牛磺酸颗粒的含量[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(4): 340.

(收稿日期: 2012-08-20 修回日期: 2012-10-18)