

采用 HPLC、CZE、LC/MS 法对国内外小牛血及小牛血清去蛋白注射液的特征图谱分析

任丽萍¹, 虞惟俊², 廖海明¹, 徐康森¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 东华大学化工学院, 上海 201620)

摘要 目的: 考察国产小牛血去蛋白注射液及小牛血清去蛋白提取物注射液中的小分子肽并与进口小牛血清去蛋白提取物注射液进行比较, 从而为进一步修订该药品的国家标准提供依据。方法: 分别采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC)、毛细管区带电泳 (CZE)、液质联用 (LC/MS) 对国内外公司的小牛血及小牛血清去蛋白提取物注射液的特征图谱进行研究。结果: 国内产品含有的组分种类少于进口产品, 不同产品的组分含量有差别。结论: 本文所用的方法可用于小牛血及小牛血清去蛋白注射液的质量对比及控制。

关键词: 小牛血去蛋白提取物注射液; 小牛血清去蛋白提取物注射液; 毛细管区带电泳; 液质联用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0209-03

Study on specific chromatogram of deproteinized calf blood injection and deproteinized calf serum injection

REN Li-ping¹, YU Wei-jun², LIAO Hai-ming¹, XU Kang-sen¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract Objective To investigate the qualities of deproteinized calf blood injection and deproteinized calf serum injection and to compare them with actovegin so as to provide the basic information for the national specification.

Method Sample products were analyzed by RP-HPLC, CZE, and LC/MS. **Results** Different products contain different kinds of ingredients in sample test. To compare with actovegin, local products have less kind of ingredients. Different products vary with each other in content. **Conclusion** These methods are suitable for the quality control of the drug.

Key words deproteinized calf blood injection, deproteinized calf serum injection, CZE, LC/MS

小牛血及小牛血清去蛋白提取物注射液是将新生几个月以内的小牛血及小牛血清, 用膜过滤技术制成相对分子质量小于 6000 的去蛋白血液提取物。该去蛋白质血液提取物含 70% 无机物质, 如电解质和微量的必需元素; 以及 30% 有机物质, 如寡糖、核酸衍生物、氨基酸、低分子多肽、糖脂类及糖和类脂代谢的中间产物等。该注射液通过促进细胞对葡萄糖的摄取和利用 (不依赖于胰岛素) 增加细胞对氧的摄取和利用, 从而使三磷酸腺苷 (ATP) 生成增加, 使细胞能量提高, 在机能缺陷、代谢受抑制的情况下和能量需求增加时, 在细胞水平促进细胞能量代谢、改善细胞功能, 从而使血流供应增加^[1]。

多肽类化合物广泛存在于自然界中, 其中对具有一定生物学活性的多肽的研究, 一直是药物开发的一个主要方向^[2]。本文对小牛血及小牛血清去蛋白提取物注射液中的多种组分进行了研究, 分别采用反相高效液相、毛细管区带电泳以及液质联用法对国内不同企业的样品以及进口药品爱维治进行比较研究, 为修订该品种的国家标准提供试验依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相系统: 996 二极管阵列检测器, 1525 二元泵, 717 自动进样器, 在线脱气机, TCM 柱温箱, Empower 液相工作站。岛津高效液相系统: SCL-10Avp LC-10AT 泵, 二极管阵列检测器 SPD

- M 10A VP 岛津 LC/MS2010A 型单级四极杆质谱仪, LC/MS Solution3.20 操作软件。毛细管区带电泳系统: Beckman P/ACE 5000 型, Beckman P/ACE station 操作软件。

爱维治 3 批, 国内 5 家同类产品各 1 批 (国内其中 1 家为小牛血清去蛋白提取物注射液)。乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钠、磷酸、氢氧化钠均为分析纯, 试验用水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: 岛津 VP- ODS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 水-乙腈 (93:7), 流动相 B: 乙腈-水 (4:1); 二元梯度洗脱 (0~40 min 流动相 B 的浓度 0 → 100%; 40~50 min 流动相 B 的浓度 100% → 100%; 50~51 min 流动相 B 的浓度 100% → 0; 51~65 min 流动相 B 的浓度 0 → 0); 检测波长 214 nm; 流速为 0.3 mL · min⁻¹; 柱温 38 °C。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源; 扫描模式为全扫描; 扫描范围 *m/z* 280~1200 正离子检测; 雾化氮气流速为 1.5 L · min⁻¹; 干燥气压力 0.02 MPa 曲形脱溶剂装置温度 250 °C, 电压 -45 V; 加热模块温度 200 °C; 离子源温度 400 °C, 电压 4.5 kV; 检测电压 1.5 kV。

2.3 毛细管区带电泳条件 电极缓冲液: 0.1 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液 (pH 2.5); 熔融石英毛细管柱 75 μm × 57 cm, 有效长度 50 cm。每次进样前依次用 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液、电极缓冲液清洗毛细管 5 min; 3.447 kPa 进样 5 s; 进样完后再进 5 s 电极缓冲液; 运行电压 18 kV; 检测波长 214 nm; 柱温 25 °C。

2.4 HPLC 特征图谱分析 样品过滤后分别进样 5 μL 于液相色谱仪中, 按“2.1”项下条件分析, 记录 HPLC 特征色谱图。爱维治与国内 5 家产品的结果比较见图 1。由图 1 可以看出, 各公司的产品所含组分基本相同; 爱维治的液相色谱图中有的组分含量较国内产品要高; 国内产品 A、C 的特征图谱与爱维治的最为一致。此外, 我们通过对比爱维治和国内产品 C 的特征图谱可以发现, 国内产品 C 中组分 X 和 Y 的含量较高。

2.5 质谱图分析 利用 LC/MS 技术, 可以对液相色谱分离后得到的色谱峰进行质谱定性分析^[3,4]。对爱维治和 5 个国内产品进行 LC/MS 分析。图 3 - A ~ G 分别表示经过液相色谱分离后的组分 1~7 的准分子离子峰, 其质荷比 (*m/z*) 分别为 475.45、

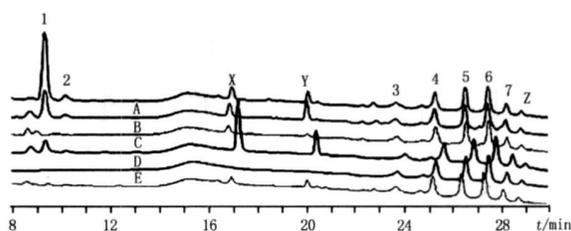


图 1 爱维治及国内产品的 HPLC 特征图谱

Fig 1 HPLC specific chromatogram comparison of Actovegin and local products

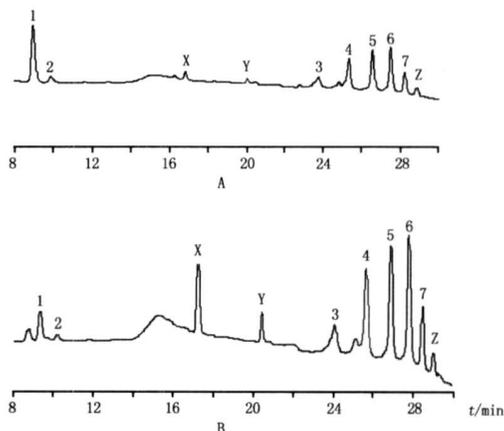


图 2 爱维治(A)、国内产品 C(B) 的 HPLC 特征图谱

Fig 2 HPLC specific chromatogram of Actovegin (A) and local product (B)

362.3, 453.45, 566.50, 679.50, 792.65, 510.30。在 HPLC 指纹图谱中国内产品 C 较爱维治高的组分 X、Y 因未能离子化所以未能得到准分子离子峰。

2.6 CZE 指纹图谱分析

CZE 的条件包括缓冲液种类、缓冲液 pH、毛细管柱、运行电压等^[5,6]。本实验取 pH 2.5 运行电压 18 kV 的条件下各组分获得良好的分离度。爱维治与国内 5 家产品的 CZE 特征图谱结果比较见图 4。从中可以看出, 爱维治所含的组分比国内产品要多, 且含量也较高; 国内产品 A 的特征图谱与爱维治最为接近, 这与 HPLC 特征图谱比较结果一致。

3 讨论

3.1 小牛血和小牛血清去蛋白提取物注射液作为多组分的生化注射剂, 除了一些常规的质控项目外, 应该研究更合适的方法来控制产品的主要成分。本试验在国内率先应用 HPLC、CZE 技术对国内外 6 家产品进行了特征图谱对比研究, 并使用质谱技术对 LC 组分进行了分析, 得到了初步的相对分子质量信息。

3.2 考虑到产品中各组分的分离度和 HPLC 仪较

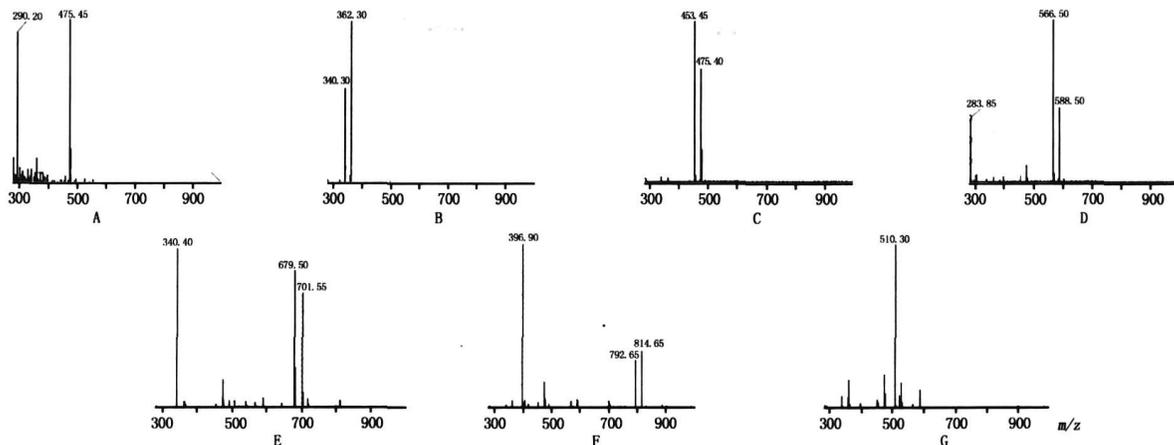


图 3 液相色谱分离所得各组分的质谱图

Fig 3 Mass spectra of LC ingredients

A~G. 组分 1~7 (component 1~7)

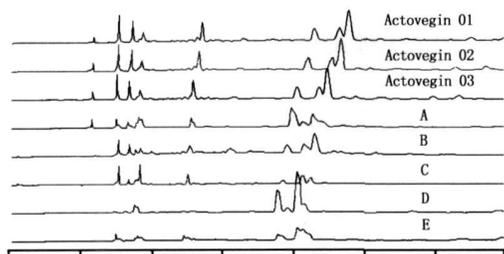


图 4 爱维治及国内产品的毛细管电泳特征图谱比较

Fig 4 CZE specific chromatogram comparison of Actovegin and local products

CZE 仪的普及度, HPLC 指纹图谱较 CZE 指纹图谱更适用于国家标准。

3.3 本试验发现, 国内产品 A 在 HPLC 和 CZE 特征图谱都与爱维治最为一致。结合呼吸活性试验结果, 除国内产品 A 活性较高外, 与国内其余产品相比, 所测的 3 批爱维治样品均具有较高活性, 且批间活性较稳定, 这与特征图谱分析结果也是一致的。

3.4 小牛血及小牛血清提取物注射液组分分离及所含组分的结构确证是当前一大难题, 有待进一步研究。

参考文献

1 REN Shu-ping(任淑萍). Comparative study of active ingredient content and biological activity between deproteinized calf serum injection and deproteinized calf blood injection(小牛血去蛋白注射液与

小牛血清去蛋白注射液有效成分含量和生物活性的比较). *Chin J Neuroanal*(中国神经医学杂志), 2006 5(8): 768

2 ZHAO Rui(赵锐), GU Qian-qun(顾谦群), GUAN Hua-shi(管华诗). Development of peptides research on separation and analysis (多肽物质分离与分析方法研究进展). *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物杂志), 2000, 75(3): 48

3 ZHAO Qian(赵芊), WANG Hong-yong(王洪允), JIANG Ji(江骥). Quantitative analysis of proteins and polypeptides by mass spectrometry (质谱与蛋白质和多肽的定量分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005 25(2): 244

4 JIANG Qing-li(蒋菁莉), XU Yan-jun(徐彦军), REN Fa-zheng(任发政), et al. Analysis of food-derived angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides by RP-HPLC and electrospray mass spectrometry(反相高效液相色谱-电喷雾质谱法分析食源性血管紧张素转换酶抑制肽). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2007 3(35): 427

5 LIAO Hai-ming(廖海明), YANG Zhao-peng(杨昭鹏), XU Kang-sen(徐康森). Determination of recombinant human insulin and its related impurities by capillary zone electrophoresis(重组人胰岛素及其相关物质的毛细管区带电泳分析法). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2000, 20(1): 13

6 LÜ Hai-hong(吕海鸿), LAO Hai-ming(廖海明), XU Kang-sen(徐康森). Studies on CZE determination of tyrosyl peptide and the related substances in its preparation(毛细管区带电泳测定酪酰亮肽及其制剂的含量和有关物质). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2005 39(11): 858

(本文于 2007 年 11 月 1 日收到)