

· 研究报告 ·

柱前衍生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

姚佳佳, 闫晨 (上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

[摘要] **目的** 建立一种柱前衍生-高效液相色谱法同时测定人凝血因子Ⅷ中 2 种氨基酸含量的方法。**方法** 以 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为衍生剂,采用 C₁₈ 色谱柱,流动相 A 为水,B 为乙腈,C 为含 4 mmol/L 三乙胺的 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH=6.4),进行梯度洗脱,流速 1.0 ml/min,检测波长 360 nm。**结果** 甘氨酸的线性范围为 2.98~14.90 g/L ($r=0.9999$),盐酸赖氨酸线性范围为 1.195~5.975 g/L ($r=0.9999$),甘氨酸和盐酸赖氨酸的平均回收率分别为 99.1% 和 98.2%。**结论** 此方法检测结果准确,可用于人凝血因子Ⅷ中甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量测定。

[关键词] 甘氨酸;盐酸赖氨酸;人凝血因子Ⅷ;柱前衍生化;高效液相色谱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0362-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.017

Glycine and lysis hydrochloride assay in human coagulation factor Ⅷ by pre-column derivation

YAO Jiajia, YAN Chen (Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method of analysis for glycine and lysis hydrochloride in human coagulation factor Ⅷ by pre-column derivation HPLC. **Methods** The sample was derivatized with 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB). HPLC was performed on a C₁₈ column with gradient elution. The mobile phase A was water, B was acetonitrile and C was 0.05 mol/L sodium acetate buffer containing 4 mmol/L trimethylamine. The flow rate was 1.0 ml/min and detection wavelength was 360nm. **Result** There was a linear range for glycine between 2.980 g/L~14.90 g/L ($r=0.9999$) and lysis hydrochloride between 1.195 g/L~5.975 g/L ($r=0.9999$). The average recovery rate of glycine and lysis hydrochloride was 99.1% and 98.2%. **Conclusion** The established method is accurate and can be used to determine the contents of glycine and lysis hydrochloride in human coagulation factor Ⅷ.

[Key words] glycine, lysis hydrochloride, human coagulation factor Ⅷ, pre-column derivation, HPLC

人凝血因子Ⅷ^[1]是由健康人的血浆经分离、提纯,并经病毒去除和灭活处理的冻干制剂。人凝血因子Ⅷ是一种不稳定的蛋白,极易失活变性,为了便于储存和运输,生产时通常采用冻干剂型。上海新兴医药股份有限公司采用甘氨酸和盐酸赖氨酸作为人凝血因子Ⅷ的冻干保护剂^[2,3]。2 种氨基酸的含量直接影响制品冻干的效果,在生产过程中必须受控在一定范围内(甘氨酸含量为 6~15 g/L,盐酸赖氨酸含量应不高于 7 g/L),因此需要快速准确地测定 2 种氨基酸的含量,有必要建立一种能同时测定甘氨酸和盐酸赖氨酸的检测方法。氨基酸的分析方法多采用将氨基酸衍生化后进行 HPLC 法,本实验

选用 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为衍生剂,氨基酸与其反应后得到二硝基苯氨基酸(DNP-氨基酸),DNP-氨基酸在紫外线 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。笔者在本公司甘氨酸含量测定方法^[4]的基础上,结合文献中有关盐酸赖氨酸的检测方法^[5]。通过梯度洗脱的方法,同时检测人凝血因子Ⅷ中甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:安捷伦 1260 液相色谱仪;色谱柱:安捷伦 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),丙氨酸对照品(国药集团化学试剂公司,分析纯,含量≥99.0%);甘氨酸对照品(Sigma 公司,分析纯,含量≥99.0%);盐酸赖氨酸对照品(Sigma 公司,分析纯,含量≥98.0%);人凝血因子Ⅷ(上海新兴医药股份有限公司,批号:

[作者简介] 姚佳佳,本科,执业药师,研究方向:生物制药,Email: betteryao81@126.com

[通讯作者] 闫晨,硕士,执业药师,研究方向:生物制药,Email: sxx_yd@163.com

20170201N、20170202N、20170303N)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 甘氨酸和盐酸赖氨酸对照品溶液

精密称取甘氨酸对照品1.5046 g和盐酸赖氨酸对照品6.097 g置100 ml容量瓶中,用注射用水定容,得甘氨酸浓度为14.90 g/L和盐酸赖氨酸浓度为5.975 g/L的对照品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液

取一瓶待检人凝血因子Ⅷ供试品放置至室温,精密量取10 ml注射用水溶解样品,然后轻轻摇动直至完全溶解,备用。

2.1.3 空白溶液

按处方配制不含甘氨酸和盐酸赖氨酸的人凝血因子Ⅷ溶液,备用。

2.1.4 甘氨酸溶液

精密称取甘氨酸对照品0.9054 g置100 ml容量瓶中,用注射用水定容,得浓度为8.963 g/L的甘氨酸溶液。

2.1.5 盐酸赖氨酸溶液

精密称取盐酸赖氨酸对照品0.3656 g置100 ml容量瓶中,用注射用水定容,得浓度为3.583 g/L的盐酸赖氨酸溶液。

2.2 试验方法

2.2.1 对照品溶液和供试品溶液的制备及衍生化

对照品溶液:精密量取1 ml对照品溶液于试管中,加入4 ml 1.5% 磺基水杨酸,混匀,取上清液1 ml于10 ml容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀备用。精密量取处理后的对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml与内标溶液各0.5 ml置10 ml容量瓶中,等待衍生化反应。

供试品溶液:精密量取1 ml供试品溶液于试管中,加入4 ml 1.5% 磺基水杨酸,混匀,取上清液1 ml于10 ml容量瓶中,用水稀释至刻度,混匀备用。精密量取处理后的供试品溶液1.0 ml与内标溶液各0.5 ml置10 ml容量瓶中,等待衍生化反应。

衍生化反应:将上述制备好的对照品溶液或供试品溶液各加0.5 mol/L的碳酸氢钠溶液(pH=9.0)2 ml,1% 2,4-二硝基氟苯(DNFB)的乙腈溶液0.4 ml混匀,60℃避光保温1 h后,取出放冷,用磷酸盐缓冲液(pH=7.0)稀释至刻度,经0.22 μm微孔滤膜过滤,取过滤液进样。

空白溶液、甘氨酸溶液、盐酸赖氨酸溶液按照供

试品溶液制备方法处理。

2.2.2 色谱测定

色谱条件:色谱柱:安捷伦 ZORBAX Eclipse plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30℃;流速:1.0 ml/min;紫外检测波长:360 nm;进样量:20 μl。以纯水为流动相A,以100%乙腈为流动相B,以含4 mmol/L三乙胺的0.05 mol/L醋酸钠缓冲液(pH=6.4)为流动相C,梯度洗脱30 min(表1)。

表1 梯度洗脱表(%)

时间(t/min)	流动相A	流动相B	流动相C
起始	17.5	17.5	65
15	17.5	17.5	65
18	0	50	50
25	0	50	50
30	17.5	17.5	65

2.3 保留时间的确定和专属性试验

空白溶液色谱图(图1)中仅有衍生化试剂2,4-二硝基氟苯(DNFB)色谱峰-1;甘氨酸溶液的色谱图(图2)有衍生化试剂2,4-二硝基氟苯(DNFB)色谱峰-1、甘氨酸衍生物峰-2、丙氨酸衍生物峰-3;盐酸赖氨酸溶液的色谱图(图3)有衍生化试剂2,4-二硝基氟苯(DNFB)色谱峰-1、丙氨酸衍生物峰-3、盐酸赖氨酸衍生物峰-4;甘氨酸和盐酸赖氨酸对照品溶液的色谱图(图4)和供试品溶液的色谱图(图5)中有衍生化试剂2,4-二硝基氟苯(DNFB)色谱峰-1、甘氨酸衍生物峰-2、丙氨酸衍生物峰-3、盐酸赖氨酸衍生物峰-4。由以上5幅色谱图可以看出,衍生化试剂2,4-二硝基氟苯(DNFB)色谱峰-1保留时间为5.3~5.5 min,甘氨酸衍生物峰-2保留时间约为6.6 min,丙氨酸衍生物峰-3保留时间约为10 min,盐酸赖氨酸衍生物峰-4保留时间约为21.1 min,保留时间上4个色谱峰没有互相干扰,且未见其他成分及衍生化试剂对测定有干扰。

2.4 系统适应性试验

甘氨酸和盐酸赖氨酸对照品溶液的色谱图中,甘氨酸衍生物与相邻色谱峰之间的分离度分别为4.433和10.515。盐酸赖氨酸衍生物与相邻的色谱峰的分离度为49.280,所测组分甘氨酸和盐酸赖氨酸的衍生物色谱峰与内标丙氨酸衍生物和衍生化试剂的色谱峰能够完全分离,互不干扰。甘氨酸衍生物的拖尾因子为1.252,丙氨酸衍生物的拖尾因子为1.194,盐酸赖氨酸衍生物的拖尾因子为1.145;

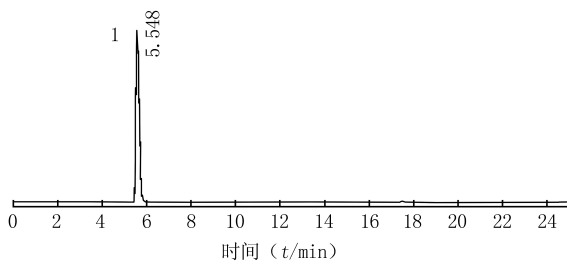


图1 空白溶液色谱图

1. 2,4-二硝基氟苯(DNFB)

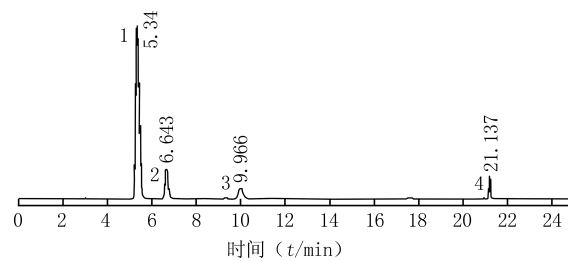


图5 供试品溶液色谱图

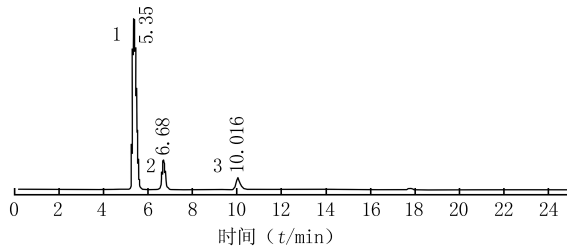
1. 2,4-二硝基氟苯(DNFB); 2. 甘氨酸衍生物;
3. 丙氨酸衍生物; 4. 盐酸赖氨酸衍生物

图2 甘氨酸溶液色谱图

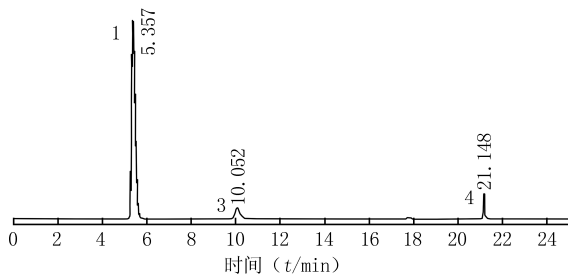
1. 2,4-二硝基氟苯(DNFB);
2. 甘氨酸衍生物; 3. 丙氨酸衍生物

图3 盐酸赖氨酸溶液色谱图

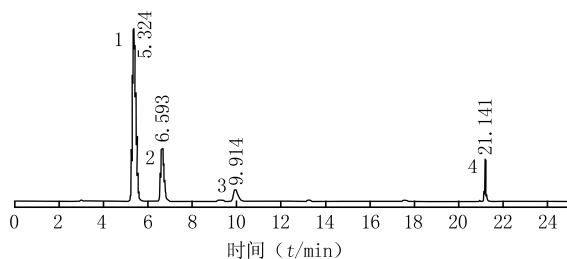
1. 2,4-二硝基氟苯(DNFB);
3. 丙氨酸衍生物; 4. 盐酸赖氨酸衍生物

图4 甘氨酸和盐酸赖氨酸对照品溶液色谱图

1. 2,4-二硝基氟苯(DNFB); 2. 甘氨酸衍生物;
3. 丙氨酸衍生物; 4. 盐酸赖氨酸衍生物

得到回归方程 $Y = 3.9902X + 0.1222$, $r = 0.9999$ 。以盐酸赖氨酸衍生物对丙氨酸衍生物峰面积比(X)对盐酸赖氨酸含量(Y)进行线性回归,得到回归方程 $Y = 6.63271X - 0.3317$, $r = 0.9999$ 。结果表明甘氨酸浓度在 $2.98 \sim 14.90$ g/L 范围内,盐酸赖氨酸浓度在 $1.195 \sim 5.975$ g/L 范围内,与峰面积比呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密量取甘氨酸和盐酸赖氨酸对照溶液 0.6 ml 按“2.2”项下方法处理,进行色谱分析,连续测定 6 次,计算得到甘氨酸的峰面积比的 RSD 为 0.1% ,盐酸赖氨酸的峰面积比的 RSD 为 0.09% ,表明精密度良好。

2.7 重复性试验

取 6 份人凝血因子 VIII 样品(批号:20170201N),分别进行样品处理,进样后根据所得到的色谱图分别计算甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量。甘氨酸的含量平均值为 8.652 g/L, RSD 为 0.3% ;盐酸赖氨酸的含量平均值为 3.392 g/L, RSD 为 1.9% 。说明此方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称取 $(0.070 \pm 10\%)$ g 甘氨酸和 $(0.029 \pm 10\%)$ g 盐酸赖氨酸 3 份,精密称取 $(0.090 \pm 10\%)$ g 甘氨酸和 $(0.036 \pm 10\%)$ g 盐酸赖氨酸 3 份,精密称取 $(0.100 \pm 10\%)$ g 甘氨酸和 $(0.043 \pm 10\%)$ g 盐酸赖氨酸 3 份,共计 9 份,加不含甘氨酸和盐酸赖氨酸的人凝血因子 VIII 溶液定容至 10 ml。上述 9 份溶液按“2.1”项进行样品处理,色谱分析,根据所得色谱图分别计算甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量,结果见表 2。

3 讨论

人凝血因子 VIII 中含有甘氨酸和盐酸赖氨酸 2 种氨基酸,作为冻干保护剂,需对这两种氨基酸的含量

(下转第 384 页)

符合拖尾因子为 $0.95 \sim 1.40$ 的要求^[6]。

2.5 线性关系考察

取甘氨酸和盐酸赖氨酸对照品溶液按“2.2”项处理,进行色谱分析。以甘氨酸衍生物对丙氨酸衍生物峰面积比(X)对甘氨酸含量(Y)进行线性回归,

fection, 1990, 18(5):280-282.

[4] JACOBS LG, SKIDMORE EA, CARDOSO LA, *et al.* Bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections[J]. Clin Infect Dis, 1994, 18(3):313-318.

[5] TRINH T, SIMONIAN J, VIGIL S, *et al.* Continuous versus intermittent bladder irrigation of amphotericin B for the treatment of candiduria[J]. J Urol, 1995, 154(6):2032-2034.

[6] LEU HS, HUANG CT. Clearance of funguria with short-course antifungal regimens: a prospective, randomized, controlled study[J]. Clin Infect Dis, 1995, 20(5):1152-1157.

[7] FAN-HAVARD P, O'DONOVAN C, SMITH SM, *et al.* Oral fluconazole versus amphotericin B bladder irrigation for treatment of candidal funguria[J]. Clin Infect Dis, 1995, 21(4):960-965.

[8] FONG IW. The value of a single amphotericin B bladder washout in candiduria[J]. J Antimicrob Chemother, 1995, 36(6):1067-1071.

[9] JACOBS LG, SKIDMORE EA, FREEMAN K, *et al.* Oral fluconazole compared with bladder irrigation with amphotericin B for treatment of fungal urinary tract infections in elderly patients[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(1):30-35.

[10] NESBIT SA, KATZ LE, MCCLAIN BW, *et al.* Comparison of two concentrations of amphotericin B bladder irrigation in the treatment of funguria in patients with indwelling urinary catheters[J]. Am J Health Syst Pharm, 1999, 56(9):872-875.

[11] 朱卫华, 马峰. 两性霉素B膀胱冲洗治疗尿路真菌感染临床分析[J]. 中外医疗, 2015, 34(18):127-128, 131.

[12] SULLIVAN KA, CAYLOR MM, LIN FC, *et al.* Comparison of amphotericin B bladder irrigations versus fluconazole for the treatment of candiduria in intensive care unit patients[J]. J Pharm Pract, 2017, 30(3):347-352.

[13] PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(4):e1-50.

[14] 李延鸿, 朱怀军. 膀胱冲洗对预防留置尿管引起尿路感染作用的系统评价[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(8):494-496.

[15] SOBEL JD, KAUFFMAN CA, MCKINSEY D, *et al.* Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group[J]. Clin Infect Dis, 2000, 30(1):19-24.

[16] TUON FF, AMATO VS, PENTEADO FILHO SR. Bladder irrigation with amphotericin B and fungal urinary tract infection systematic review with Meta-analysis[J]. Int J Infect Dis, 2009, 13(6):701-706.

[收稿日期] 2017-07-03 [修回日期] 2018-01-19
[本文编辑] 陈盛新

(上接第364页)

表2 人凝血因子Ⅷ回收率试验结果

成分	理论浓度 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测得浓度 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
甘氨酸	7.40	7.38	99.73	98.8
	6.87	6.79	98.84	
	7.18	7.15	99.59	
	9.04	8.80	97.35	
	8.95	8.99	100.45	
	8.62	8.55	99.19	
	10.93	10.97	100.37	
	10.04	9.80	97.61	
	9.90	9.50	95.96	
	3.05	3.05	100.00	
盐酸赖氨酸	2.81	2.71	96.45	98.8
	2.90	2.83	97.59	
	3.74	3.80	101.61	
	3.64	3.65	100.28	
	3.58	3.52	98.33	
	4.38	4.33	98.86	
	4.45	4.38	98.43	
	4.29	4.17	97.21	

同时进行检测,但目前《中华人民共和国药典》和文献中尚无适当的检测方法。本实验选用2,4-二硝基氟苯(DNFB)为衍生剂,采用梯度洗脱的方法,使人凝血因子Ⅷ中的甘氨酸和盐酸赖氨酸分离完全,可以同时测定这2种氨基酸的含量,简化了检测程序,同时保证了结果的准确、可靠。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部):2015年版[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:272.

[2] 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.

[3] 朱敖兰,杨洁. 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.

[4] 高莉萍,李萍,姚佳佳. 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.

[5] 孙向红,张建华. HPLC法测定盐酸赖氨酸的含量[J]. 齐鲁药事,2010(6):345-346.

[6] 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.

[收稿日期] 2017-11-22 [修回日期] 2018-04-18
[本文编辑] 李睿旻