

HPLC 法测定眼氨肽注射液中高分子蛋白

白海娇¹, 覃婷婷¹, 丁 一²

1. 天津市药品检验所, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立眼氨肽注射液中高分子蛋白的检测方法, 比较不同厂家生产的眼氨肽注射剂中高分子蛋白的质量分数。**方法** 采用高效液相色谱法测定, TSK-GEL2000SWxl 分子排阻色谱柱 (300 mm×7.8 mm, 5 μm), 以三氟乙酸-乙腈-水 (0.1:10:90) 为流动相, 体积流量为 0.6 mL/min, 检测波长 214 nm, 进样体积 10 μL。采用面积归一化法计算高分子蛋白的质量分数。**结果** 不同厂家生产的眼氨肽注射液中的高分子蛋白质量分数普遍较低, 在 0.020%~0.245%。**结论** 与原方法 20% 磺基水杨酸法检测蛋白质比较, 本方法的准确度更好, 能有效地测定眼氨肽注射液中的高分子蛋白。

关键词: 眼氨肽注射剂; 高分子蛋白; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)07-0734-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.07.008

Determination of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection by HPLC

BAI Hai-jiao¹, Qin Ting-ting¹, DING Yi²

1. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection, and to compare the contents of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection from different manufacturers. **Methods** HPLC method was carried out on a TSK-GEL2000SWxl molecular exclusion chromatography column (300 mm × 7.8 mm, 5 μm) with trifluoroacetic acid - acetonitrile - water (0.1 : 10 : 90) as mobile phase. The detection wavelength was set at 214 nm. The injection volume was 20 μL at the flow rate of 0.6 mL/min. Contents of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection were determined by area normalization method. **Results** The contents of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection from different manufacturers were lower, and the contents were in the range of 0.020% — 0.245%. **Conclusion** Compared with 20% sulfosalicylic acid method in determining high molecular weight proteins, the established method has better accuracy, and can quantify the high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection effectively.

Key words: Ocular Extractives Injection; high molecular weight proteins; HPLC

眼氨肽注射液系由牛、羊或猪动物眼为原料, 经乙醇提取等处理工艺后制得的灭菌注射液, 临床上用于治疗玻璃体浑浊、非化脓性角膜炎、巩膜炎、角膜炎、视力疲劳及青少年假性近视等眼疾。本品为动物脏器提取的多组分生化制剂, 属于高风险品种, 但现行质量标准^[1]中采用 20% 磺基水杨酸检测蛋白质, 方法的灵敏度有限。考虑到高分子蛋白可能引起过敏反应, 为了保证药品的安全性, 本实验

探索采用高效液相色谱法对眼氨肽注射液中高分子蛋白进行检测^[2-4]。

1 仪器与试剂

Waters 2690/996 液相色谱仪, DAD 检测器。17 种氨基酸对照品 (批号 140624-200805) 均由中国食品药品检定研究院提供; 胰岛素 (批号 155X14.07.2) 由诺和诺德公司提供; 乙腈 (色谱纯) 由康科德公司提供; 三氟乙酸 (分析纯) 由天津市华东试剂厂

收稿日期: 2014-05-15

作者简介: 白海娇 (1976—), 女, 沈阳药科大学药物制剂专业硕士, 研究方向为生化药品检验。Tel: (022) 23374073 E-mail: bhjdx@163.com

提供。

眼氨肽注射液样品由天津生物化学制药有限公司（规格 2 mL : 2 g, 批号分别为 20110901、20120302、20111101）、镇江恒新药业有限公司（规格 1 mL : 2.5 g, 批号 111101）、济南维尔康生化制药有限公司（规格 2 mL : 2 g, 批号 1107394）提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

TSK-GEL2000SWx1 分子排阻色谱柱（300 mm×7.8 mm, 5 μm），以三氟乙酸-乙腈-水（0.1 : 10 : 90）为流动相，体积流量为 0.6 mL/min，检测波长 214 nm，进样体积 10 μL。

2.2 胰岛素对照溶液的制备

以人胰岛素（相对分子质量为 5 808）作为时间对照，按面积归一化计算，保留时间先于胰岛素峰的峰面积之和为大分子蛋白。称取胰岛素对照品适量，加水溶解并稀释成含胰岛素 1 mg/mL 的溶液，作为对照溶液。

2.3 专属性试验

本品为脏器提取制剂，前期的试验表明本品中主要含有多种氨基酸，各企业产品中所含的氨基酸含量和比例不尽相同，综合考虑各产品的氨基酸比例和含量，实验配制成 17 种氨基酸混合溶液作为空白溶液。

取氨基酸混合溶液、眼氨肽注射液和胰岛素对照溶液，按照以上色谱条件进样测定，色谱图见图 1。所有氨基酸的色谱峰均出现在 15 min 以后，对检测不构成影响。胰岛素对照色谱峰的保留时间为 13.4 min 左右。

2.4 精密度试验

取 1 mg/mL 胰岛素对照溶液，重复进样 6 次，分别测定保留时间和峰面积，结果保留时间和峰面积的 RSD 值分别为 0.06%、0.23%。

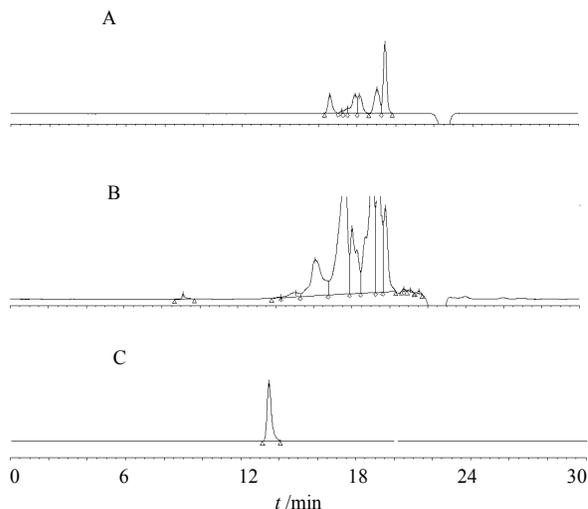


图 1 混合氨基酸 (A)、眼氨肽注射液 (B) 和胰岛素对照 (C) 的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed amino acids (A), Ocular Extractives Injection (B), and insulin (C)

2.5 重复性试验

取同一批（批号 20111101）眼氨肽注射液样品，平行测定 6 次，按以上色谱条件，分别进样 10 μL，测定峰面积值，计算质量分数，结果大分子蛋白的平均质量分数为 0.10%，RSD 值为 1.8%。

2.6 样品测定

取每批样品 3 瓶，合并溶液，采用上述色谱条件检测 3 个企业生产的眼氨肽注射液 5 批，分别进样 10 μL，按面积归一化法计算大分子蛋白的质量分数，每批样品重复测定 2 次，计算平均值，结果见表 1。

结果显示眼氨肽注射液中的大分子蛋白质量分数普遍较低，在 0.020%~0.245%。目前多肽类制剂的质量标准中，多数将大分子蛋白的质量分数限制规定为 2.0%，根据本研究的结果，各厂家生产的眼氨肽注射液中大分子蛋白均符合要求。

表 1 眼氨肽注射液中大分子蛋白的测定结果

Table 1 Determination of high molecular weight proteins in Ocular Extractives Injection

| 生产单位 | 批号 | 大分子蛋白/% |
|---------------|----------|---------|
| 天津生物化学制药有限公司 | 20110901 | 0.040 |
| 天津生物化学制药有限公司 | 20120302 | 0.020 |
| 天津生物化学制药有限公司 | 20111101 | 0.095 |
| 镇江恒新药业有限公司 | 111101 | 0.075 |
| 济南维尔康生化制药有限公司 | 1107394 | 0.245 |

2.7 与磺基水杨酸检测法的比较

取眼氨肽注射液 1 mL, 加入 20%磺基水杨酸 1 mL, 如发生浑浊, 表明样品中含有蛋白质。结果采用此方法检测所有 5 批次样品均未发现浑浊。

3 讨论

本方法采用凝胶色谱法, 与质量标准中的原方法磺基水杨酸法比较, 专属性和准确性有所提高, 能够有效地定量检测眼氨肽注射剂中的大分子蛋白的质量分数, 为今后眼氨肽注射液的质量标准提高提供参考。

建议在眼氨肽注射液的标准中, 增订大分子蛋白的检查项目, 并建议生产企业在内控标准中也增

加此项, 以保证药品制剂的安全性。

参考文献

- [1] 国家药品标准地方标准上升国家标准 [S]. 眼氨肽注射液质量标准. 第 9 册: 262-264.
- [2] 国家药品标准地方标准上升国家标准 [S]. 胸腺肽溶液质量标准. 第 16 册: 118-120.
- [3] 马志强, 蔡程科, 刘璐, 等. 凝胶色谱法对舒血宁注射液中高分子量物质的检查 [J]. 中医药学报, 2013, 41(3): 31-32.
- [4] 孙运霞, 赵磊石, 李静莉. 高效液相色谱法测定疏血通注射液中高分子量物质 [J]. 医药导报, 2006, 26(4): 350-351.