

离子色谱法测定鹿瓜多肽注射剂中半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和果糖

张晶, 苏喆, 覃婷婷, 韩晓捷*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 建立鹿瓜多肽注射液、注射用鹿瓜多肽中半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和果糖的离子色谱测定方法。方法 使用 Dionex CarboPac PA20 色谱柱 (150 mm×3 mm, 6 μm); Dionex PA20 Guard 预柱 (30 mm×3 mm, 6 μm); 流动相: 水 - 250 mmol/L 氢氧化钠溶液 - 1 mol/L 醋酸钠溶液, 梯度洗脱; 体积流量: 0.4 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 25 μL; 检测器: 电化学检测器。结果 半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖的线性范围均为 0.1~10.0 μg/mL ($r > 0.995 0$), 平均回收率分别为 96.52%、97.80%、97.03%、97.72%、98.35%, RSD 值分别为 2.88%、1.49%、2.01%、1.83%、1.84%。结论 该方法快速准确、重现性好, 可用于鹿瓜多肽注射剂中糖类杂质的测定。

关键词: 鹿瓜多肽注射液; 注射用鹿瓜多肽; 半乳糖; 葡萄糖; 甘露糖; 蔗糖; 果糖; 离子色谱法

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)07-1747-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.07.010

Determination of galactose, glucose, mannose, sucrose, and fructose in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection by ion chromatography

ZHANG Jing, SU Zhe, QIN Tingting, HAN Xiaojie

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a ion chromatography method for determination of galactose, glucose, mannose, sucrose, and fructose in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection and Cervus and Cucumis Polypeptide for injection. **Methods** Dionex CarboPac PA20 column (150 mm × 3 mm, 6 μm) and Dionex PA20 Guard column (30 mm × 3 mm, 6 μm) was used. Mobile phase was water - 250 mmol/L sodium hydroxide solution - 1 mol/L sodium acetate solution with gradient elution. Volume flow rate was 0.4 mL/min, column temperature was set at 30 °C, and injection volume was 25 μL. Electrochemical detector was adopted. **Results** The linear ranges of galactose, glucose, mannose, sucrose, and fructose were 0.1 — 10.0 μg/mL ($r > 0.995 0$), and their average recoveries were 96.52%, 97.80%, 97.03%, 97.72%, and 98.35% with RSD 2.88%, 1.49%, 2.01%, 1.83%, and 1.84%. **Conclusion** The method is fast, accurate, and has good reproducibility, and can be used for the determination of carbohydrate impurities in Cervus and Cucumis Polypeptide Injection.

Key words: Cervus and Cucumis Polypeptide Injection; Cervus and Cucumis Polypeptide for injection; galactose; glucose; mannose; sucrose; fructose; ion chromatography

鹿瓜多肽注射剂包括鹿瓜多肽注射液、注射用鹿瓜多肽, 是从梅花鹿骨骼和甜瓜子中提取、纯化制备的多组分生化药。鹿瓜多肽注射剂主要用于风湿、类风湿关节炎、骨折、创伤修复等, 不良反应主要有皮疹、瘙痒、过敏性休克、呼吸急促、胸闷等^[1-3]。鹿瓜多肽注射剂所用的原料甜瓜子为葫芦科属植物甜瓜 *Cucumis melo* L. 的干燥成熟种子, 含半

乳糖、葡萄糖、结晶性球蛋白、谷蛋白等^[4-5]。另一原料为梅花鹿鹿骨中含多糖 0.35%^[6]。糖类杂质存在于鹿瓜多肽注射剂中可能会降解产生出新的杂质, 如 5-羟甲基糠醛, 还可能与多肽、氨基酸发生美拉德反应产生糖基化杂质、挥发性杂环化合物以及小分子醛、酮类物质, 影响药品质量。离子色谱法利用单糖、双糖、低聚寡糖等糖类成分在碱性

收稿日期: 2024-04-11

基金项目: 天津市市场监督管理委员会科技计划项目 (2020-W26); 天津市药品监督管理局科技计划项目 (2020-YJ02)

作者简介: 张晶, 女, 助理研究员, 硕士, 从事生化药品检验与研究。E-mail: zhangjing0119@126.com

*通信作者: 韩晓捷, 女, 副研究员, 从事生化药品检验与研究。E-mail: hxjtjdc@163.com

环境下可离解为阴离子的特性,经阴离子交换柱分离,可通过脉冲安培检测器进行检测^[8-9]。相比较而言,离子色谱法样品前处理简单,无需衍生化,灵敏度高,方法相对更成熟,在食品、药品、生物制品等领域应用较多^[10]。本实验采用离子色谱法对鹿瓜多肽注射液、注射用鹿瓜多肽中半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和果糖进行了测定,旨在分析其中糖类杂质的存在情况,为多组分生化药物中杂质分析提供技术参考。

1 仪器与材料

Dionex ICS-6000 离子色谱系统,包括带脱气装置的四元梯度泵、色谱柱箱、电化学检测器(安培检测器)、色谱数据采集、处理 Chromeleon7 色谱工作站(美国 Thermo Fisher 公司); Milli-Q IQ 7000 纯水仪(德国 Merck 公司,实验用水均为去离子水); XS205 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Cleanert S C18 固相萃取柱(天津博纳艾杰科技有限公司); Supelco Visiprep 固相萃取装置(美国 Supelco 公司)。

葡萄糖(批号 110833-202109,质量分数 99.9%)、半乳糖(批号 100226-201807,质量分数 100.0%)、甘露糖(批号 140651-201805,质量分数 100.0%)、蔗糖(批号 111507-202105,质量分数 99.8%)、果糖(批号 100231-202008,质量分数 99.9%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);醋酸钠(色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司)。

鹿瓜多肽注射液,哈尔滨誉衡制药有限公司生产,批号 20211122(规格 4 mL:8 mg)、批号 20220606(规格 2 mL:4 mg)。注射用鹿瓜多肽,黑龙江迪龙制药有限公司生产,批号 220211201(规格为 8 mg)、批号 120220210(规格 4 mg);黑龙江世药业有限公司生产,批号 2203305(规格为 8 mg)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Dionex CarboPac PA20 色谱柱(150 mm×3 mm, 6 μm); Dionex PA20 Guard 预柱(30 mm×3 mm, 6 μm); 流动相:水(A)-250 mmol/L 氢氧化钠溶液(B)-1 mol/L 醋酸钠溶液(C),梯度洗脱(0~20 min, 94% A、6% B; 20~30 min, 60%~30% A、40% B、0~30% C; 30~40 min, 20% A、80% B; 40~60 min, 94% A、6% B); 体积流量:

0.4 mL/min; 柱温:30 °C; 进样量:25 μL; 检测器:电化学检测器,金工作电极,Ag/AgCl 参比电极,四电位波形。

2.2 固相萃取柱的活化

取固相萃取柱,先用 30 mL 甲醇洗脱,再用 30 mL 水洗脱。制备样品溶液时,滤过样品后,弃去 15 mL 滤液,取后续滤液进行分析。每批样品更换固相萃取柱,不重复使用。

2.3 溶液的制备

2.3.1 流动相的制备 流动相 A:水,超声脱气并充氮气保护。流动相 B:250 mmol/L 氢氧化钠溶液,量取 50% 氢氧化钠溶液 26.4 mL,加水溶解至 2 000 mL,移至塑料淋洗液瓶中,超声脱气并充氮气保护。流动相 C:1 mol/L 醋酸钠溶液,称取 82.03 g 醋酸钠,加水溶解至 1 000 mL,移至塑料淋洗液瓶中,超声脱气并充氮气保护。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖对照品各 10 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,混匀,即得 1 mg/mL 对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液 1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,混匀。逐级稀释得到各组分质量浓度分别为 10、5、2、1、0.5、0.1 μg/mL 的线性对照品溶液。

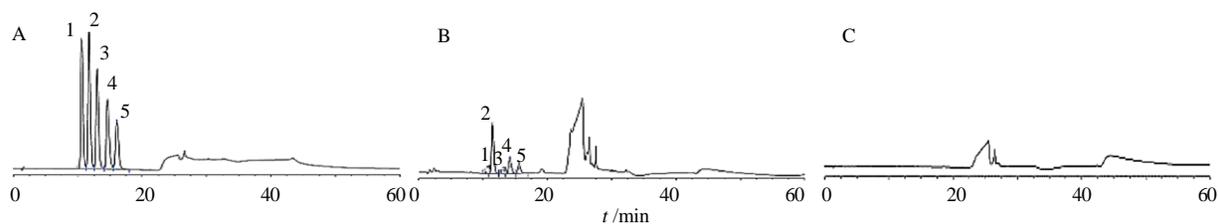
2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取鹿瓜多肽注射液 1 mL,置 20 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,过活化后的固相萃取柱。取注射用鹿瓜多肽 1 支,加水溶解至 2 mg/mL,精密量取样品溶液 1 mL,置 20 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,过活化后的固相萃取柱。

2.4 系统适用性和空白干扰试验

取水过活化后的固相萃取柱,即为空白溶液。精密量取对照品贮备液各 1 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,混匀即得 10 μg/mL 对照品溶液,作为系统适用性溶液。系统适用性溶液测定结果见图 1。半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖 5 种成分的分离度分别为 1.80、1.87、2.13、1.79、1.93,理论板数分别为 4 745、5 338、5 526、5 395、5 529;此外空白溶液对上述组分的测定无干扰。

2.5 线性关系考察

取线性对照品溶液测定峰面积。以半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程,见表 1。结果表明,各成分在 0.1~10.0 μg/mL 线性良好。



1-半乳糖, 2-葡萄糖, 3-甘露糖, 4-蔗糖, 5-果糖。
1-galactose, 2-glucose, 3-mannose, 4-sucrose, 5-fructose.

图 1 系统适用性溶液 (A)、鹿瓜多肽注射液 (批号 20211122, B) 和空白溶液 (C) 的离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatograms of system suitability solution (A), Cervus and Cucumis Polypeptide Injection (batch 20211122, B), and blank solution (C)

表 1 各成分的回归方程

Table 1 Regression equations of components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
半乳糖	$Y=1.491 X-0.038$	0.999 5	0.1~10.0
葡萄糖	$Y=2.554 X+0.127$	0.998 0	0.1~10.0
甘露糖	$Y=0.238 X-0.019$	0.999 5	0.1~10.0
蔗糖	$Y=0.739 X-0.085$	0.997 5	0.1~10.0
果糖	$Y=0.388 X+0.024$	0.999 5	0.1~10.0

2.6 检测限和定量限试验

取线性对照品溶液适量, 用水稀释成不同质量浓度的溶液, 记录色谱, 检测限以 3 倍信噪比计算, 定量限以 10 倍信噪比计算, 结果半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖的检测限分别为 0.012、0.005、0.020、0.007、0.020 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限分别为 0.025、0.010、0.050、0.033、0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7 精密度试验

取系统适用性溶液, 连续进样测定 6 次, 记录各成分的峰面积。结果显示, 半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、1.4%、1.3%、1.3%、1.0%, 保留时间的 RSD 值分别为 0.2%、0.1%、0.7%、0.2%、0.2%。

2.8 稳定性试验

取批号 20211122 鹿瓜多肽注射液样品, 制备供试品溶液, 分别于室温放置 0、5、10、25、30 h 后进样测定, 记录各成分的峰面积, 结果半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、1.1%、1.1%、1.4%、1.8%, 说明供试品溶液在 30 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取批号 20211122 鹿瓜多肽注射液样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 计算

各成分的质量浓度。结果半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖的平均质量浓度分别为 3.9、74.8、20.2、85.9、95.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD 值分别为 0.6%、0.3%、0.6%、0.3%、0.5%。

2.10 准确度试验

精密量取批号 20211122 鹿瓜多肽注射液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液 1、2、4 mL, 加水稀释至刻度, 制备 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 种质量浓度的供试品溶液, 每个质量浓度配制 3 份。进样测定, 标准曲线法计算各成分, 所测得的量与加入的标准量进行比较, 计算回收率。结果半乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖的平均回收率分别为 96.52%、97.80%、97.03%、97.72%、98.35%, RSD 值分别为 2.88%、1.49%、2.01%、1.83%、1.84%。

2.11 样品测定

对 3 个厂家生产的 5 批鹿瓜多肽制剂样品进行测定, 采用标准曲线法计算半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和果糖, 结果见表 2。鹿瓜多肽注射液中可检测到 5 种糖, 半乳糖的量最低, 葡萄糖、蔗糖、果糖的量相对较高, 为半乳糖量的 20 多倍; 迪龙、江世两个厂家生产的注射用鹿瓜多肽中葡萄糖、果糖含量接近, 果糖含量最高, 均未检出甘露糖、蔗糖, 迪龙生产的制剂中未检出半乳糖。

表 2 鹿瓜多肽注射剂中半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖和果糖的测定结果 (n = 2)

Table 2 Determination of galactose, glucose, mannose, sucrose, and fructose in Cervus and Cucumis Polypeptide injection(n = 2)

厂家	批号	规格	质量分数/质量浓度				
			半乳糖	葡萄糖	甘露糖	蔗糖	果糖
誉衡	20211122	4 mL : 8 mg	3.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	70.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	23.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	83.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	92.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
	20220606	2 mL : 4 mg	3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	76.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	17.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	87.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	96.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
迪龙	220211201	8 mg	未检出	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	未检出	未检出	32.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
	120220210	4 mg	未检出	0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	未检出	未检出	32.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
江世	2203305	8 mg	1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$	未检出	未检出	27.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$

样品测定结果显示,含糖量最高的为誉衡生产的鹿瓜多肽注射液,平均含糖总量为 278 $\mu\text{g}/\text{mL}$,迪龙、江世所生产的注射用鹿瓜多肽中糖的种类、含量相仿,含糖总量为 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。分析原因与产品处方中甜瓜籽的占比有关,制备过程中鹿骨多肽与甜瓜子多肽的比例:誉衡产鹿瓜多肽注射液为 2 : 1,迪龙、江世产注射用鹿瓜多肽为 3 : 1。此外纯化工艺中所用的超滤膜相对分子质量大小、超滤时间均有可能影响糖的含量,导致糖类杂质的种类、含量的差异。

3 讨论

目前上市的多组分生化药多达 28 种,组成成分复杂,仅靠质量标准难以评价其提取工艺优劣^[11]。这类药物中多含有肽类、蛋白质、多糖等物质,杂质谱具有一定的特殊性和复杂性。鹿瓜多肽注射剂的现行质量标准中包括蛋白质含量、无菌、可见异物等项目,没有针对糖类杂质的测定方法和限度要求。生产企业提取制备中间产物的过程中有除杂蛋白、超滤的步骤,两种原料中均存在糖类物质,其去除效果不明确。对于多肽、氨基酸类药品,糖类物质属于杂质成分,且易溶于水,极性较强,不易与小肽、氨基酸分离^[7],可能会与多肽、氨基酸发生反应产生新的杂质,影响药品的质量。

糖类化合物在紫外区一般无吸收或吸收较弱,测定方法有比色法、气相色谱法、高效液相色谱法、离子色谱法和质谱法。比色法常用于总糖的测定,特异性差;气相色谱联用质谱可实现糖类成分较全面的定性研究^[12],但样品需要衍生化,衍生经常用到有毒化学试剂,操作较繁琐;高效液相色谱采用示差折光检测器时样品无需衍生,但灵敏度较低,用蒸发光散射检测器是目前中药糖类成分测定的常用方法^[12-14],使用较多的氨基柱通常不耐用,重复性有待提高。质谱法虽然最灵敏,但仪器耗材价

格昂贵,测定方法推广普及有一定的困难^[12]。离子色谱法是利用单糖、双糖、低聚寡糖等糖类成分在碱性环境下可离解为阴离子的特性,经阴离子交换柱分离,可通过脉冲安培检测器测定,在生物制品、多糖疫苗正在逐步推广应用。

在建立分析方法时对柱温、流动相 B 的初始比例、体积流量进行了优化,分别考察了柱温为 25、27、30 $^{\circ}\text{C}$ 时,流动相 B 初始比例为 3.0%、4.5%、6.0%、7.0% 时,体积流量为 0.35、0.40、0.45 mL/min 时 5 种糖的分离效果。结果显示,体积流量对各成分之间的分离度影响不大,而柱温、流动相 B 初始比例对果糖的出峰顺序有明显影响,果糖会随着色谱条件的变化与其相邻的甘露糖或蔗糖重合。综合考虑分离效果和柱压,本实验的色谱条件设定为柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、流动相 B 初始比例为 6.0%、体积流量为 0.40 mL/min 。

鹿瓜多肽注射剂属于多组分生化药,成分复杂,且富含多肽、氨基酸,如果不经萃取除杂直接进入分析,基体会干扰糖类成分的测定,同时工作电极容易被蛋白等物质附着,影响电化学反应的速率和稳定性,降低仪器的灵敏度,导致重现性变差。本实验建立的离子色谱法快速准确、重现性好,经固相萃取柱除去复杂基质后回收率良好,可用于鹿瓜多肽注射剂中糖类杂质的测定。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 徐卫峰. 鹿瓜多肽静脉滴注致过敏性休克 [J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(3): 200-224.
- [2] 潘辉. 鹿瓜多肽注射液静脉滴注致急性下壁心肌梗死样心电图改变一例 [J]. 中国医药, 2013, 8(8): 1149.
- [3] 王建芳, 邓风云. 鹿瓜多肽注射液的临床应用研究进展 [J]. 临床合理用药, 2019, 12(7A): 177-179.
- [4] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 [M]. 第 2 版. 北

- 京: 人民卫生出版社, 1984: 602.
- [5] 李盈, 翟铁红, 马秀君. 甜瓜子的药学研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(11): 72.
- [6] 王斐娴, 李峰, 李倩. 鹿角及鹿骨中总多糖含量比较分析 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 12(36): 2971-2974.
- [7] Liu W, Cao Y, Ren Y, *et al.* Simultaneously quantitative analysis of peptides and chemical components in Cervus and Cucumis polypeptide injection (Songmeile[®]) using reversed phase liquid chromatography-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1617: 460827.
- [8] 张伟, 张彤, 任连杰, 等. 离子色谱法测定骨瓜提取物注射液中糖的含量 [J]. 中国药房, 2016, 27(3): 386-389.
- [9] 李京, 宋玉娟, 韩春霞, 等. 高效阴离子交换脉冲安培法测定糖肽类药物中游离糖含量 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1547-1552.
- [10] 慕艳红, 王晶. 离子色谱在多糖疫苗及多糖蛋白结合疫苗质量控制中的应用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2016, 40(6): 78-82.
- [11] 任丽萍, 范慧红. 我国生化药品的质量现状与展望 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 10(3): 1-4.
- [12] 曹树萍, 聂黎行, 刘丽娜, 等. HPLC-ELSD 及 GC-MS 法分析参麦注射液及中间体糖类成分 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1741-1745.
- [13] 刘静, 韩春霞, 姜岩, 等. 注射用丹参(冻干)中糖类成分的两种色谱测定方法比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 556-560.
- [14] 雪媛, 肖波, 张治峰, 等. 不同采收期肉苁蓉中松果菊苷、毛蕊花糖苷、半乳糖醇、甜菜碱及可溶性多糖量的测定及其道地性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3841-3846.

【责任编辑 解学星】