

反相高效液相色谱法分析纤溶酶纯度的方法研究

邵昭慧, 周长明, 王 静*

北京市药品检验所 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206

摘要: 目的 建立纤溶酶反相高效液相色谱纯度测定方法。方法 采用SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ SG300 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以0.1%三氟乙酸溶液-乙腈(95:5)为流动相A, 以0.08%三氟乙酸溶液-乙腈(20:80)为流动相B, 进行梯度洗脱, 体积流量为0.7 mL·min⁻¹, 检测波长280 nm, 柱温40 °C。参照2020年版《中国药典》四部9101药品质量标准分析方法验证指导原则进行专属性、检测限、耐用性考察。应用所建立的方法和分子排阻色谱法对3批样品纯度进行检测。结果 建立的反相色谱法专属性强, 检测限为0.01%, 耐用性强。对3批样品进行检测, 质量分数在93.5%~96.9%, 结果准确。结论 建立反相色谱法测定纤溶酶纯度, 分辨率更高、重现性更好, 可进行更好的质量控制。

关键词: 纤溶酶; 反相高效液相色谱; 纯度

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)02-0320-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.017

Study on purity analysis of plasminase by reversed-phase high performance liquid chromatography

GAO Zhaohui, ZHOU Changming, WANG Jing

Beijing Institute for Drug Control, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China

Abstract: **Objective** To establish a method of reversed-phase high performance liquid chromatography to determine the purity of fibrinolytic enzyme. **Methods** Using SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ SG300 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) or equivalent performance column. The mobile phase A was 0.1% trifluoroacetic acid solution - acetonitrile (95:5), and the mobile phase B was 0.08% trifluoroacetic acid solution: acetonitrile (20:80) with gradient elution at the flow rate of 0.7 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 280 nm, and the column temperature was 40 °C. The specificity, detection limit and durability were investigated by referring to the guiding principles of drug quality standard analysis method validation of IV 9101 of Chinese Pharmacopoeia (2020 edition). The method and molecular exclusion chromatography were used to detect the purity of three batches of samples. **Results** The established reversed-phase chromatography has strong specificity, detection limit of 0.01% and durability. Three batches of samples were tested, the mass fraction was 93.5%—96.9%, and the results were accurate. **Conclusion** A reversed-phase chromatography method was established for the determination of plasminase purity with higher resolution, better reproducibility and better quality control.

Key words: fibrinolytic enzyme; reversed-phase chromatography; purity

随着经济的发展,国民生活方式和饮食习惯发生了改变,血栓栓塞性疾病越来越成为重大的健康问题,在血栓病治疗的过程中,选用快速有效的溶栓药物是重中之重。纤溶酶是从长白山白眉蝮蛇毒中提取的蛋白水解酶,具有降纤抗凝、溶解血栓等作用,其制剂广泛地应用于临床治疗脑卒中等疾病^[1-3]。国家药品标准第九册^[4]中收录了纤溶酶,

纯度检查是蛋白质药物检测的重要指标之一,蛋白纯度分析通常要求采用基于不同分析原理的方法,但纤溶酶现行质量标准中两个纯度检查法分别采用SDS凝胶电泳和分子排阻色谱,都是分子筛原理,没有建立反相高效液相色谱测定纯度的方法,目前也尚未见到利用高效液相色谱法检测纤溶酶纯度的文献报道。本研究建立了反相高效液相色谱

收稿日期: 2021-05-03

第一作者: 邵昭慧(1988—),女,博士,研究方向为蛋白质类药物的质量控制。Tel:18010281070 E-mail:zhaohui_gao111@126.com

*通信作者: 王 静,副主任药师。Tel:18010281150 E-mail:wangjing-bidc@bjfda.gov.cn

谱法对纤溶酶纯度进行测定,为评价和控制原料药的质量提供实验依据。

1 仪器和试剂

LC-20AT型高效液相色谱仪、SPD-M20A 二极管阵列检测器、LC-solution 色谱工作站(日本岛津公司);乙腈、三氟乙酸为色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司);水为去离子水;纤溶酶(北京赛升药业股份有限公司,批号 220180915、220180922、220180929)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

供试品溶液 A:精密称取纤溶酶(批号 220180915)10.02 mg,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;供试品溶液 B:精密称取纤溶酶(批号 220180915)9.04 mg,加水稀释至 3.0 mL,摇匀。空白溶液:流动相 A:流动相 B(55:45)。

2.2 色谱条件^[5-6]

色谱柱:SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ SG300(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A:0.1% 三氟乙酸溶液-乙腈(95:5),流动相 B:0.08% 三氟乙酸溶液-乙腈(20:80),采用梯度洗脱(表1);检测波长 280 nm;体积流量 0.7 mL·min⁻¹;柱温 40 °C;进样体积 50 μL。参照 2020 年版《中国药典》四部 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则^[7]进行方法学考察。

表 1 流动相洗脱梯度

Table 1 Elution gradient of mobile phase

t/min	流动相比例/%	
	A	B
0	55	45
5	55	45
30	32	68
30.1	55	45
35	55	45

2.3 专属性考察

取空白溶液、供试品溶液 A 进样,纤溶酶峰与相邻色谱峰的分离度大于 1.5,空白溶液不干扰检测,色谱图见图 1-A、B。

2.3.1 强光照射破坏 取 1.5 mL 供试品溶液 A,在强光下(4 700 lx)照射 24 h,按“2.2”项色谱条件进样,色谱图见图 1-C,与图 1-B 对比,在相对保留时间 0.81 倍的位置产生了 1 个杂质峰,且能与主峰有效分离。

2.3.2 高温破坏 取 1.5 mL 供试品溶液 A,在 55 °C

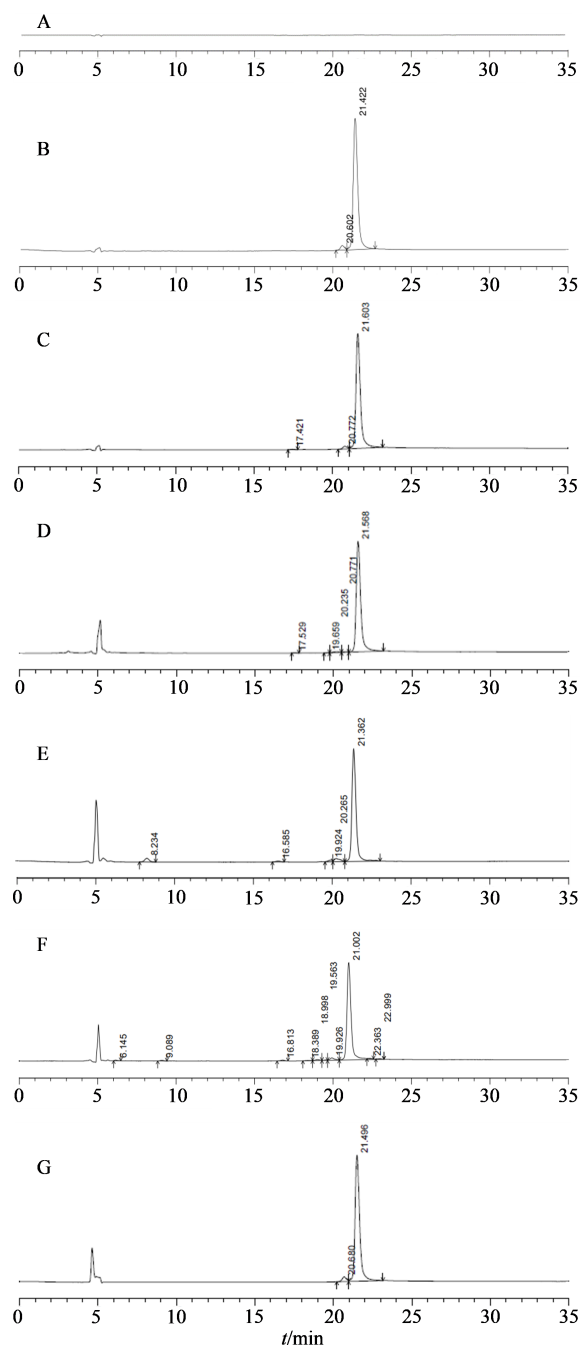


图 1 空白(A)、供试品溶液 A(B)以及经光照破坏(C)、经高温破坏(D)、经酸破坏(E)、经碱破坏(F)、经氧化破坏(G)的供试品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of blank solution (A), sample A solution (B), and sample destroyed by light (C), high temperature (D), acid (E), alkali (F), oxidation (G)

放置 1 h,放冷至室温,按“2.2”项色谱条件进样,色谱图见图 1-D,与图 1-B 对比,样品有较大的破坏,在相对保留时间 0.81~0.94 倍的位置产生了多个杂质峰,且均能与主峰有效分离。

2.3.3 酸破坏 取供试品溶液 B 200 μL,加 5 mmol·L⁻¹ 的盐酸溶液 200 μL,摇匀,放置 30 min,加 5 mmol·L⁻¹ 氢

氧化钠溶液 200 μL , 摇匀, 按“2.2”项色谱条件进样, 色谱图见图 1-E, 与图 1-B 对比, 样品有较大的破坏, 在相对保留时间 0.39~0.93 倍的位置产生了多个杂质峰, 且均能与主峰有效分离。

2.3.4 碱破坏 取供试品溶液 B 200 μL , 加 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 200 μL , 摇匀, 放置 30 min, 加 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 200 μL , 摇匀, 按“2.2”项色谱条件进样, 色谱图见图 1-F, 与图 1-B 对比, 样品有较大的破坏, 在相对保留时间 0.29~1.10 倍的位置产生了多个杂质峰, 且均能与主峰有效分离。

2.3.5 氧化破坏 取供试品溶液 A 200 μL , 加 1% 的过氧化氢 10 μL , 摇匀, 放置 15 min, 按“2.2”项色谱条件进样, 色谱图见图 1-G, 与图 1-B 对比, 未产生新的明显杂质峰, 表明氧化对本品没有明显破坏, 即纤溶酶氧化稳定性较好。

2.4 检测限

精密量取供试品溶液 A 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 再精密量取上述溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为检测限溶液, 按“2.2”项色谱条件进样, 记录色谱图, 以信噪比 3:1 计算检测限, 见图 2。经计算, 检测限为 0.01%。

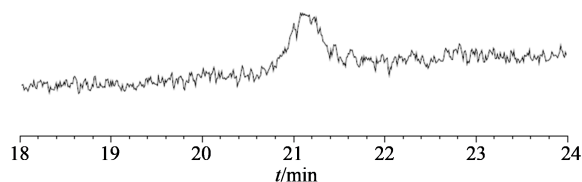


图2 检测限色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of detection limit

2.5 耐用性

使用岛津 CAPCELL PAK C_{18} SG300(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 改变柱温分别为 35、45 $^{\circ}\text{C}$, 精密量取供试品溶液 A 50 μL , 其余色谱条件同“2.2”项, 进样测定, 色谱图见图 3。主峰与相邻色谱峰的分度符合系统适用性要求。

改变体积流量分别为 0.67、0.96 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 精密量取供试品溶液 A 50 μL , 其余色谱条件同“2.2”项, 进样测定, 主峰与相邻色谱峰的分度符合系统适用性要求。

使用相同品牌不同批号的色谱柱, 按“2.2”项色谱条件, 精密量取供试品溶液 A 50 μL 进行测定, 主峰与相邻色谱峰的分度符合系统适用性要求。

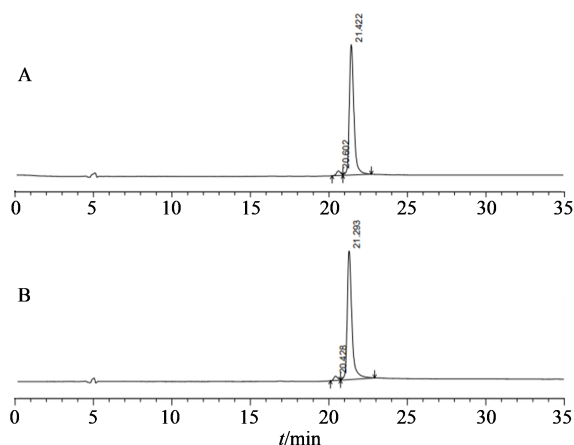


图3 35 $^{\circ}\text{C}$ (A)、45 $^{\circ}\text{C}$ (B) 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of 35 $^{\circ}\text{C}$ (A) and 45 $^{\circ}\text{C}$ (B)

2.6 样品测定

2.6.1 反相高效液相色谱法 取纤溶酶样品, 用流动相稀释制成 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白溶液, 取 50 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按面积归一法计算, 检测结果在 93.5%~96.9%, 供试品中纤溶酶峰相对质量分数不低于 90.0%。

2.6.2 分子排阻色谱法 参照国家药品标准第九册^[4]中收载的纤溶酶质量标准进行检测, 按面积归一化法计算, 供试品中纤溶酶峰相对质量分数不得低于 95.0%。结果见表 2。

表2 样品测定结果

Table 2 Test results of samples

样品	纤溶酶相对质量分数/%	
	反相高效液相色谱	分子排阻色谱法
220180915	96.9	98.3
220180922	93.7	98.8
220180929	93.5	99.3

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

纤溶酶属于蛋白质大分子, 采用反相色谱法检测时选用了大孔径的 C_{18} 色谱柱, 不但有利于有关蛋白的检出, 而且色谱峰的峰型和分离效果也更好。

3.2 进样量的选择

考察了不同进样量 (30、50 μL) 对峰面积的影响, 同一个样品, 进样量为 30 μL 时, 杂质质量为 5.4%, 进样量为 50 μL 时, 杂质质量为 6.3%。随着进样量的增加, 检测的灵敏度也越高, 杂质峰更容易检出, 但主峰的残留也会增大, 如有连续多批样品需要同时检测, 可以在供试品后插入空白溶剂, 将残留完全洗脱出来, 不会对后一批样品的纯度结果造成

影响。

3.3 柱温的影响

分别在柱温25、35、40、45℃取样测定,结果表明随着温度的升高,色谱峰的分离度越好,考虑到色谱柱的温度适用范围,最终选择40℃作为柱温。

3.4 纯度结果的比较

采用分子排阻色谱法检查纯度,检测结果均高于95.0%,而用建立的反相色谱法测得3批样品检测结果均在93.5%~96.9%。就实验结果看,新建立的反相高效液相色谱法主峰峰形好,与相邻杂质峰分离度高,考虑到分子排阻色谱法本身的局限性,反相高效液相色谱法分辨率更高、重现性更好,可以更好地对纯度进行分析。

本研究建立了反相高效液相色谱法分析纤溶酶纯度的方法,该方法专属性强、耐用性好,有利于对该产品进行更好的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈少强. 阿托伐他汀联合纤溶酶治疗短暂性脑缺血发作的临床疗效及其对脑梗死的预防效果[J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(30): 43-45.
Chen S Q. Clinical efficacy of atorvastatin combined with fibrinolytic enzyme in the treatment of transient ischemic attack and its preventive effect on cerebral infarction [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2019, 12(30): 43-45.
- [2] 赵文岩. 丁苯酞联合纤溶酶治疗大面积脑梗死55例效果观察[J]. 中国医药指南, 2019, 17(27): 189.
Zhao W Y. Effect of butylphthalide combined with fibrinolytic enzyme in treating 55 cases of large area cerebral infarction [J]. Guide China Med, 2019, 17(27): 189.
- [3] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. «中国心血管病报告2018»概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
Hu S S, Gao R L, Liu L S, et al. Summary of the «2018 Report on Cardiovascular Diseases in China» [J]. Chin Circulat J, 2019, 34(3): 209-220.
- [4] 国家药品标准 WS-10001-(HD-0804)-2002 [S]. 2002.
National Drug Standard WS-10001-(HD-0804)-2002 [S]. 2002.
- [5] 程速远, 王超众, 李 晶, 等. 蛇毒血凝酶纯度分析方法研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(8): 1398-1401.
Cheng S Y, Wang C Z, Li J, et al. Study on the purity analysis method of hemocoagulase [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(8): 1398-1401.
- [6] 刘 芳, 刘紫鹃, 沈忠耀. 反相色谱分离蚯蚓纤溶酶的初步研究[J]. 生物工程学报, 1996, 12(S1): 294-296.
Liu F, Liu Z J, Shen Z Y. Study on separation of fibrenolytic enzyme from the earthworm by reversed phase HPLC [J]. Chin J Biotechnol, 1996, 12(S1): 294-296.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.

[责任编辑 兰新新]