

· 研究报告 ·

注射用甘露聚糖肽两种含量测定方法的比较

金伟华, 陈 华, 张 明, 蒲志强 (成都军区总医院药剂科, 四川 成都 610083)

[摘要] **目的** 比较注射用甘露聚糖肽的两种含量测定方法。**方法** 分别采用分光光度法和高效液相色谱法测定 D-甘露糖的含量。**结果** 分光光度法测定中, 供试品溶于苯酚溶液和硫酸中, 于 490 nm 波长处检测, D-甘露糖衍生物浓度线性范围是 10.2~51 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.9991$), 平均含量为 92.14%, RSD 平均值为 1.17%。HPLC 法测定中, 用色谱柱: Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液 (20:80), 流速: 1 ml/min; 检测波长: 250 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μl 。检测结果, 平均含量为 83.47%, RSD 平均值为 0.65%, 两种方法均能有效测定 D-甘露糖的含量。**结论** 分光光度法测定的平均含量较高, 但检测中使用的苯酚有特殊臭味、有毒、具腐蚀性, 对操作者会造成一定的危险性; HPLC 法专属性强, 色谱图更直观, 对操作者的危害性和刺激性较小。同时建立一种测定 D-甘露糖的新方法。

[关键词] 注射用甘露聚糖肽; 高效液相色谱法; 分光光度法; D-甘露糖

[中图分类号] R927; R979.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)01-0062-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.017

Comparison two kinds of content determination method of mannatide for injection

JIN Weihua, CHEN Hua, ZHANG Ming, PU Zhiqiang (Department of Pharmacy, Chengdu General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective** To compare two methods in the determination of mannatide for injection. **Methods** The contents were determined by spectrophotometry and HPLC method. **Results** In the samples determined by Spectrophotometric Determination, soluble in phenol solution and sulfuric acid, was detected at wavelength 490 nm, D- mannose derivatives linear concentration range is 10.2-51 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.9991$), the average content was 92.14%, the average RSD value was 1.17%. In the HPLC determination, with color spectrum column: Gemini C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase acetonitrile -0.02 mol/L ammonium acetate solution (20:80), flow rate: 1 ml/min, the detection wavelength was at 250 nm, column temperature: 30 $^{\circ}\text{C}$, sample size: 10 μl detection. The average content ws 83.47%, the average RSD value was 0.65%, the content of two kinds of methods could effectively determine the D- mannose. **Conclusion** The average content for spectrophotometry was higher, but the phenol was used in detection of special odor, poisonous, corrosive, would cause a certain risk. HPLC was exclusive, chromatogram was more intuitive, on the operator harmfulness and less irritating. A new method for the determination of D- mannose was established at the same time.

[Key words] mannatide for injection; HPLC; spectrophotometry; D-mannose

注射用甘露聚糖肽, 商品名力尔凡, 是我国首创的新型免疫增强剂, 为国内首创原研药品之一, 拥有中国完全自主知识产权。甘露聚糖肽是从健康人口腔分离的一株 α -溶血性链球菌菌株经深层培养、发酵提取而得到的一种具有免疫活性和抗肿瘤作用的糖肽类物质, 具有明显的增强人体免疫功能及抗肿瘤的作用。临床上用于免疫功能低下、反复呼吸道感染、白细胞减少症和再生障碍性贫血及肿瘤的辅助治疗。国家药品标准 WS1-XG-053-2000-2005 收

载了甘露聚糖肽的质量标准, 并采用分光光度法建立了含量测定方法, 含量限度规定为: 含 α -甘露聚糖肽以 D-甘露糖计应不得少于 80%。笔者采用分光光度法和高效液相色谱法分别测定 D-甘露糖的含量。分光光度法采用苯酚-硫酸法, 高效液相色谱测定法为自创方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); AB135-S 型电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司, 精度: 0.000 01 g]; DU730 型紫外可见分光光度计 (美国贝克曼库尔特有限公司);

[作者简介] 金伟华, 本科, 副主任药师. 研究方向: 医院药学. Tel: (028)86570424; E-mail: jwh311@sina.com

HH-S24S 数显恒温水浴锅(上海君竺仪器制造有限公司);HU3120B 超声波清洗器;单联分装通风柜(成都宜邦科析);101-2A 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司);AP-01P 型真空泵(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);KGF-10 口服液灌装机(海门市飞虹机械制造有限公司)。

1.2 试药 注射用甘露聚糖肽(成都利尔药业有限公司,批号:1309112、1311051、1311141);D-甘露糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140651-200602,供含量测定用);1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP,纯度 $\geq 99.0\%$,成都市科龙化工试剂厂,批号:20120801);苯酚(纯度 $\geq 99.0\%$,成都市科龙化工试剂厂,批号:2014033101);硫酸(纯度95%~98%,成都市科龙化工试剂厂,批号:20101020);乙腈、甲醇均为色谱纯,水为三重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果^[1-10]

2.1 分光光度法

2.1.1 对照品溶液的制备 取经105℃干燥至恒重的D-甘露糖对照品约5mg,精密称定,置100ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.1.2 供试品溶液的制备 取注射用甘露聚糖肽1支(规格:5mg),将内容物转移至100ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.1.3 检测波长的确定及标准曲线的建立 精密量取对照品溶液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0ml,分别置具塞试管中,各加水至1ml,再加3%苯酚溶液1ml,摇匀,迅速加入硫酸4.5ml,摇匀,放置至室温,以0管为空白,于200~650nm波长之间扫描,D-甘露糖衍生物在490nm处有最大吸收,故选择490nm为检测波长。在490nm处测定吸光度,以对照品浓度(x)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=16.284x-0.0685$ ($r=0.9991$)。结果表明D-甘露糖衍生物浓度在10.2~51 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系,符合 Lambert-Beer 定律,说明根据吸光度来计算供试品中D-甘露糖含量是可靠的。

2.1.4 稳定性试验 精密称取对照品适量,配制成25.5 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,置具塞试管中,按“2.1.3”项下方法操作,于0、4、8、16、24h测定吸光度,计算RSD值。结果该溶液在不同时间测得的吸光度无明显变化,RSD值为1.71%,表明样品溶液显色后在24h内稳定性良好。

2.1.5 供试品的含量测定 精密量取供试品溶液

1ml,照标准曲线制备项下的方法测定,由回归方程计算D-甘露糖的含量,结果见表1。

表1 供试品含量测定结果($n=3$)

批号	测定浓度 ($\rho_{\text{B}}/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	百分含量 (%)	RSD (%)
1309112	45.64	91.28	1.30
	46.31	92.62	
	45.13	90.26	
1311051	46.27	92.54	1.12
	46.85	93.70	
	47.32	94.64	
1311141	46.13	92.26	1.09
	45.84	91.68	
	45.16	90.32	

2.2 高效液相色谱法

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Gemini C₁₈(250mm \times 4.6mm,5 μm);流动相:乙腈-0.02mol/L乙酸铵溶液(20:80),流速:1ml/min;检测波长:250nm;柱温:30℃;进样量:10 μl 。

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液 精密称取D-甘露糖对照品11.4mg,置100ml量瓶中,加水适量使溶解,用水定容至刻度,摇匀,得到质量浓度为114 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品贮备液。取该储备液5、10、15、20ml,分别置25ml量瓶中,用水定容至刻度,制备成质量浓度分别为22.8、45.6、68.4、91.2 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液。

2.2.2.2 供试品溶液 取注射用甘露聚糖肽1支(批号:1309112),将内容物转移至25ml量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,精密量取2ml置于10ml棕色玻璃瓶,加入3mol/L的盐酸溶液2ml,抽真空,封口,摇匀,110℃水解2h,冷却,用3mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,即得。

2.2.2.3 空白溶液 精密量取2ml水,置于棕色玻璃瓶中,按“2.2.2.2”项下方法操作,制成不含甘露聚糖肽的空白溶液。

2.2.3 系统适用性试验 取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各0.8ml,分别加入0.5mol/L的PMP甲醇溶液与0.3mol/L的氢氧化钠溶液各0.8ml,混匀,70℃水浴反应100min。冷却后加0.3mol/L的盐酸溶液0.9ml,用三氯甲烷洗涤3次,每次4ml,弃去三氯甲烷液,最后一次将混合液转移至量筒中,记录水层体积后,用注射器吸取水层上清液作为HPLC进样液。进样液经微孔滤膜过滤后,分别精密吸取10 μl ,照“2.2.1”项下色谱条

件注入色谱仪,记录色谱图。结果表明,空白溶液对D-甘露糖的测定无干扰,待测峰分离度良好,理论塔

板数按D-甘露糖峰计算不低于5 000,分离度大于1.5。见图1。

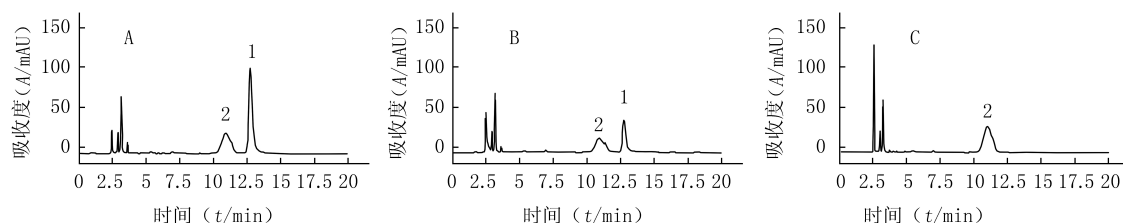


图1 HPLC 色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;C.空白溶液;1.D-甘露糖衍生物;2.PMP 残留峰

2.2.4 线性关系考察 分别取“2.2.2.1”项下22.8、45.6、68.4、91.2、114 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,按“2.2.3”项下方法衍生处理后,进样测定,记录色谱图。以对照品质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y = 18\,730x + 1\,989$ ($r = 0.9997$)。结果表明,D-甘露糖检测质量浓度的线性范围为22.8~114 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2.5 精密度试验 取质量浓度为114 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,按“2.2.3”项下方法衍生处理后,进样测定,连续进样6次,记录色谱图,计算峰面积的 $\text{RSD} = 0.85\%$ ($n = 6$),表明此方法的精密度符合要求。

2.2.6 重复性试验 分别量取同一批样品6份,按“2.2.2.2”、“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理,进样测定,记录色谱图,结果平均含量为44.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $\text{RSD} = 1.48\%$ ($n = 6$),表明此方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取样品1份,按“2.2.2.2”、“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理,分别于0、1、2、4、6、24 h 内进样测定,记录色谱图,计算峰面积的 $\text{RSD} = 1.37\%$ ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验 取已知含量的样品,精密加入D-甘露糖对照品溶液适量(45.6、68.4、91.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),制备成低、中、高3种质量浓度的溶液,按“2.2.2.2”、“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理,进样测定,记录峰面积,计算回收率,结果见表2。

2.2.9 样品含量测定 取样品3批,按“2.2.2.2”、“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液后衍生处理,进样测定,记录峰面积,计算含量,本品含甘露聚糖肽以D-甘露糖计算,结果见表3。

2.3 两种方法比较 以上试验结果表明,两种方法均能有效测定D-甘露糖的含量,达到国家药品标准规定的含量限度;虽然分光光度法测得含量较高,但

表2 回收率试验结果($n = 3$)

已知量 ($m/\mu\text{g}$)	加入量 ($m/\mu\text{g}$)	测得总量 ($m/\mu\text{g}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
44.8	45.6	90.3	99.78	101.24	1.52
		91.7	102.85		
		90.9	101.10		
44.8	68.4	112.8	99.42	99.76	1.42
		112.2	98.54		
		114.1	101.32		
44.8	91.2	135.1	99.01	100.69	1.46
		137.2	101.32		
		137.6	101.75		

表3 样品含量测定结果($n = 3$)

样品批号	测定浓度 ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	百分含量 (%)	RSD (%)
1309112	42.4	84.86	0.45
	42.6	85.26	
	42.8	85.63	
1311051	41.7	83.31	0.71
	41.3	82.68	
	41.1	82.13	
1311141	40.9	81.84	0.78
	41.6	83.12	
	41.2	82.37	

检测中使用的苯酚有特殊臭味、有毒、且腐蚀性强,对操作者存在一定的危险性,从而给操作者带来一定的心理负担,以及对该方法的排斥倾向。高效液相色谱法测定注射用甘露聚糖肽的色谱图更直观,专属性更强,对操作者危害性和刺激性相对较小,使操作者更乐于使用该方法,因此,高效液相色谱法测定注射用甘露聚糖肽的含量优于分光光度法。

3 讨论

3.1 供试品的预处理^[10,11] 因为甘露糖没有紫外吸收基团,不能用于紫外检测,为此笔者采用PMP化学衍生法使甘露糖带上紫外吸收基团。PMP作

为衍生化试剂可以在温和的水浴条件下与糖链进行定量反应;甘露糖衍生物在高效液相色谱检测中,灵敏度较高,重现性好。

由于甘露聚糖肽完全由不同链长的甘露聚糖肽分子构成,不存在单糖、双糖等小分子糖类,因此首先应水解甘露聚糖肽得到甘露糖。多糖的水解常采用盐酸、硫酸、三氟乙酸,经过试验并权衡各种溶剂的优缺点,本研究最终采用 3 mol/L 的盐酸溶液作为水解溶媒。

甘露聚糖肽的酸水解过程,为使其反应完全不受外界因素干扰,采用了棕色瓶真空封口的工艺,将反应溶液装入 10 ml 棕色瓶中,用真空泵抽真空,立即盖上瓶盖,然后用灌装机封口,摇匀,110 °C 水解 2 h,确保反应更加完全。

3.2 PMP 的残留物峰高于目标峰的处理 在前期的研究^[11]中,由于操作方法不完善,导致 PMP 的残留物峰高于目标峰,本研究进一步完善了 PMP 的萃取操作,在油/水两相分离时,使三氯甲烷萃取过量的 PMP 更为彻底,目标峰更为突出,从而使 HPLC 测定甘露聚糖肽的方法更加优化。

3.3 用分光光度法的不足 分光光度法使用了试剂苯酚和硫酸,二者均具有一定危险性,操作者应谨慎使用。苯酚常温下为固体,在试剂瓶中凝固成大块状,不方便称量;苯酚有腐蚀性,接触后会局部蛋白质变性,而且具有特殊臭味,闻之,可引起胸闷、恶心,吸入高浓度蒸气可致头痛、头晕。分光光度法的精密度相对较差,且没有色谱图,看不出目标峰的分离效果;本研究分光光度法测出的含量高于 HPLC 法,是因为 HPLC 法样品衍生化等前处理过

程相对烦琐,萃取上下层分离时,有一定的误差。但是权衡分析,认为 HPLC 法优于分光光度法。

【参考文献】

- [1] 陈立江,王菁,刘宇,等.南瓜多糖含量测定方法比较[J].辽宁大学学报,2014,41(1):76-81.
- [2] 钟方晓,任海华,李岩.多糖含量测定方法比较[J].时珍国医国药,2007,18(8):1916-1917.
- [3] 冯泽岸,巩慧敏,邵婷玑,等.南沙参中多糖含量测定方法的建立及比较[J].中国药师,2012,15(3):290-293.
- [4] 任磊,李慧勇,张清波,等.苯酚硫酸法定量测定桔梗流浸膏中多糖的研究[J].黑龙江医药,2014,27(2):227-230.
- [5] 方崇波,赵夏雨,吴巧凤.苯酚硫酸法测定猕猴桃多糖注射剂中多糖的含量[J].海峡药学,2010,22(10):64-66.
- [6] 刘立超,黄洪林,赖正权,等.苯酚硫酸法测定栀子水溶性多糖含量[J].安徽医药,2005,9(11):831-832.
- [7] 章乐建,泮玉华,赵颖飞.高效液相色谱法测定乐清栽培的铁皮石斛不同年份甘露糖的含量[J].海峡药学,2012,24(3):79-80.
- [8] 毛幼儿,周桂芬.基于柱前衍生化 HPLC 法分析铁皮石斛茎和叶多糖中甘露糖的含量[J].江西中医学院学报,2011,23(4):38-39.
- [9] Sato T, Katayama K, Arai T, et al. Simultaneous determination of serum mannose and glucose concentrations in dog serum using high performance liquid chromatography [J]. Res Vet Sci, 2008, 84(1):26-29.
- [10] 郝桂堂,陈尚卫,朱松,等.对氨基苯甲酸衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖及糖醛酸组成[J].色谱,2007,25(1):75-79.
- [11] 金伟华,陈华,张明,等.甘露聚糖肽滴鼻液的制备及其质量控制[J].中国药房,2014,25(9):828-830.

【收稿日期】 2014-12-12 【修回日期】 2015-04-14

【本文编辑】 顾文华

(上接第 35 页)

- [3] 王蕾,李武平,孙惠英,等.战伤急救止血技术新进展[J].解放军护理杂志,2007,24(12):45-46.
- [4] 陶阿丽,金耀东,刘金旗,等.中药白及化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].江苏农业科学,2013,41(11):6-9.
- [5] 王大太,郭树忠,张旭东,等.纤维蛋白胶于粉对兔肝创面的止血效果及应用剂量[J].中国康复理论与实践,2006,12(4):307-308.
- [6] 梁佩红,叶春婷,李思明,等.复合 I 型胶原海绵创伤止血的动物实验研究[J].创伤外科杂志,2002,4(5):274-275.
- [7] 毕宏达,李学拥,王玉,等.沸石对猪致命性血管损伤模型的止血作用[J].西北国防医学杂志,2006,27(3):164-166.
- [8] 朱元元,邱彦,鲁毅,等.血余炭止血包止血效果的实验研究[J].药学实践杂志,2011,29(6):431-434.
- [9] 董莉,董永喜,刘星星,等.白及多糖对大鼠血小板聚集、凝血功能及 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}表达的影响[J].贵阳医学院学报,2014,39(4):459-462.
- [10] 林福林,杨昌云,杨薇薇,等.中药白及的现代研究概况[J].中国医院药学杂志,2013,33(7):571-573.
- [11] Michinori K, Noriko S, Miho Y, et al. Application studies of Rhizoma Bletillae (rhizomes of *Bletilla striata*) on atopidermatitis [J]. Nat Med, 2003, 57(2):55-60.
- [12] 陈玉,张晓芳,朱剑东.中药白及对变链菌产酸和黏附影响的实验研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2008,18(7):390-392.
- [13] 施伟民,高飞,沈亮亮,等.中药白及和地榆对角质形成细胞游走的不同影响[J].同济大学学报(医学版),2004,25(4):275-277.
- [14] 仇树林,王晓,李兵,等.白芨胶载重组人表皮生长因子对创面表皮细胞 DNA 含量及周期的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(1):63-66.

【收稿日期】 2015-02-12 【修回日期】 2015-06-02

【本文编辑】 顾文华