

• 论 著 •

HPGPC-RID 法测定右旋糖酐 20 分子量及其分布的可行性研究

梁 珊, 王爱秀, 王靖睿, 张锦波, 李小娟, 黄群惠, 朱衍志[△]

(兰州生物技术开发有限公司, 甘肃 兰州 730046)

[摘要] **目的** 建立高效凝胶渗透色谱-示差折光检测器(HPGPC-RID)测定右旋糖酐 20 分子量及其分布的方法, 并对该方法进行可行性研究。**方法** 对新建方法进行专属性、准确度、重复性及耐用性验证, 并评价新建方法与《中国药典》2020 版(二部)收录方法检测结果的等效性。**结果** 新建方法专属性、准确度、重复性、耐用性良好, 且与药典方法等效, 可用于右旋糖酐 20 分子量及其分布的测定。与此同时, 新建方法能避免药典方法中硫酸钠(Na_2SO_4)峰对右旋糖酐 20 峰的干扰。**结论** 相比于药典方法, 新建方法对右旋糖酐 20 分子量及其分布测定具有更好的适用性。

[关键词] 高效凝胶渗透色谱-示差折光检测器; 右旋糖酐 20; 分子量; 分子量分布; 等效性

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.12.001 中图法分类号:R286.0

文章编号:1009-5519(2024)12-1981-05

文献标识码:A

Feasibility study on the determination of molecular mass and its distribution
of dextran 20 by HPGPC-RID method

LIANG Shan, WANG Aixiu, WANG Jingrui, ZHANG Jinbo,

LI Xiaojuan, HUANG Qunhui, ZHU Yanzhi[△]

(Lanzhou Biotechnology Development Limited Company, Lanzhou, Gansu 730046, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the determination of molecular mass and distribution of dextran 20 by high performance gel permeation chromatography-refractive index detector(HPGPC-RID) and conducting a feasibility study on this new method. **Methods** The specificity, accuracy, repeatability and durability of the new method were verified, evaluating the equivalence between the new method and the Chinese Pharmacopoeia 2020 version(Part II) method. **Results** The specificity, accuracy, repeatability and durability of the new method were good. The results were equivalent to pharmacopoeia methods, and could be used to determine the relative molecular mass and relative molecular mass distribution of dextran 20. At the same time, the new method could avoid the interference of sodium sulfate(Na_2SO_4) peak to dextran 20 peak in the pharmacopoeia method. **Conclusion** Compared to pharmacopoeia method, the new method has better applicability for the determination of relative molecular mass and relative molecular mass distribution of Dextran 20.

[Key words] High performance gel permeation chromatography-refractive index detector method; Dextran 20; Relative molecular mass; Relative molecular mass distribution; Equivalence

丹麦 Pharmacosmos 公司生产的右旋糖酐 20 是注射用 A 型肉毒毒素(衡力[®])的辅料之一, 按照《中国药典》的规定, 需对辅料进行全项检查^[1]。本研究采用 Agilent 1260 型液相色谱仪, 以 TSKgel G4000 PWXL 为色谱柱, 右旋糖酐 20 为供试品, 对《中国药典》2020 版(二部)收录的右旋糖酐 20 分子量及其分布方法(以下简称药典法)进行适用性确认, 结果发现: 供试品色谱峰末端与硫酸钠(Na_2SO_4 , 流动相成分之一)色谱峰起始端部分重叠, 干扰 10% 小分子部分重均分子量(M_w)的准确测定, 存在检验风险。本研究根据峰型特点, 尝试除去流动相中的 Na_2SO_4 , 增

大叠氮化钠(NaN_3 , 流动相另一成分)浓度, 试图实现以 NaN_3 代替 Na_2SO_4 给予流动相足够的离子强度, 从而消除 Na_2SO_4 的干扰, 当将流动相由药典法中的 0.71% Na_2SO_4 (内含 0.02% NaN_3) 替换为 0.1% NaN_3 溶液时, 风险消除。本研究预建立一种检测右旋糖酐 20 分子量及其分布的方法, 对该方法进行方法学考察的同时与药典法测定结果进行比较, 研究以新建方法替代药典方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 标准物质: 系列葡聚糖分子量对照品 (M_w 分别为 667 800、409 800、273 000、

147 600、80 900、48 600、23 800、11 600、5 220、1 270, 批号分别为: BCCF0391、BCCD1915、BCCD8671、BC-CF6119、BCBW9428、BCCB0791、BCBW9413、BC-CB3530、BCBZ5728、BCBZ9414) 购自美国 Sigma 公司; 葡萄糖(批号: 140637-201203) 及右旋糖酐 D2000 (批号: 140646-201203) 购自中国食品药品检定研究院。10% NaN_3 溶液购自爱尔兰 Reagecon 公司; Na_2SO_4 购自国药集团化学试剂有限公司; 超纯水来自纯水-超纯水一体机, 为本实验室自制。Agilent 1260 型液相色谱仪及示差-折光检测器、GPC 工作站及计算软件购自美国 Agilent 公司; TSKgel G4000 PWXL 色谱柱购自日本 TOSOH 公司; XPR205 型十万分之一电子天平购自美国 METTLER TOLEDO 公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制

1.2.1.1 流动相(0.1% NaN_3 溶液) 准确量取 10% NaN_3 溶液 10 mL, 用超纯水稀释并定容至 1 000 mL, 经 0.45 μm 膜过滤后备用。

1.2.1.2 系列葡聚糖分子量对照品溶液 准确称取系列葡聚糖分子量对照品各适量, 流动相溶解并稀释制成每毫升中约含 10 mg 的溶液备用。

1.2.1.3 葡萄糖溶液及右旋糖酐 D2000 溶液 准确称取葡萄糖对照品及右旋糖酐 D2000 对照品各适量, 流动相溶解并稀释制成每毫升中约含 10 mg 的溶液备用。

1.2.1.4 样品溶液 准确称取右旋糖酐 20 样品适量, 流动相溶解并稀释制成每毫升中约含 10 mg 的溶液, 振摇, 放置过夜备用。

1.2.2 预定的色谱参数 色谱柱: TSKgel G4000 PWXL(7.8 mm \times 300.0 mm, 10 μm); 流动相: 0.1% NaN_3 溶液; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35 $^\circ\text{C}$; 进样量: 20 μL ; 检测器: RID。

1.2.3 方法的验证

1.2.3.1 系统适用性 取系列葡聚糖分子量对照品、葡萄糖、右旋糖酐 D2000 溶液及样品溶液, 在预定的色谱参数下按右旋糖酐 D2000、系列葡聚糖分子量对照品、样品溶液及葡萄糖溶液的顺序依次进样各 1 次, 共做 3 次测试, 记录各色谱峰保留时间(T)及葡萄糖峰的理论塔板数。

1.2.3.2 标准曲线 取系列葡聚糖分子量对照品溶液, 在预定的色谱参数下各进样 1 次, 采用 Agilent GPC 软件绘制, 以各对照品溶液测得的 T 为横坐标, 以对照品溶液峰位分子量(MW)为纵坐标的 4 阶标准曲线 $MW = aT^4 + bT^3 + cT^2 + dT + e$ 。

1.2.3.3 专属性 取流动相及样品溶液各进样 1 次, 记录色谱图, 考察流动相是否会对右旋糖酐 20 峰

型产生干扰。

1.2.3.4 准确度 (1) 配制 6 份 M_w 为 23 800 的葡聚糖对照品溶液(此对照品与右旋糖酐 20 样品 M_w 相近, 故选择), 在预定的色谱参数下各进样 1 次, 代入标准曲线计算 M_w , 以测定值与理论值(23 800)的比值计算回收率, 考察准确度。(2) 配制 6 份样品溶液, 在预定的色谱参数下各进样 1 次, 代入标准曲线计算 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w , 以测定值与厂家标示值的比值计算回收率, 考察准确度。

1.2.3.5 重复性 配制 6 份样品溶液, 在预定的色谱参数下各进样 1 次, 代入标准曲线计算右旋糖酐 20 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w , 计算 6 次结果的相对标准偏差(RSD)。

1.2.3.6 耐用性 于不同时间配制流动相, 共配制 3 份, 在预定的色谱参数下进样测定右旋糖酐 20 样品的 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w , 计算 3 次结果的 RSD, 考察不同批次流动相对测定结果的影响。

1.2.3.7 样品溶液稳定性 配制 1 份样品溶液, 2~8 $^\circ\text{C}$ 条件下贮存, 分别于配制 0、6、9、24 h 及 30 h 后进样测定其 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w , 将 6、9、24 h 及 30 h 进样结果与 0 h 结果进行比较, 计算变异系数(CV), 考察样品溶液的稳定性。

1.2.4 方法的初步应用 取丹麦 Pharmacosmos 公司生产的右旋糖酐 20 共 3 批, 并分别配制为样品溶液, 在预定的色谱参数下各进样 1 次, 代入标准曲线计算 3 批右旋糖酐 20 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w 。

1.2.5 方法一致性考察 配制 6 份样品溶液, 分别采用药典法和本研究新建方法进样测定 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w 。

1.3 统计学处理 对 1.2.5 测得的 2 组数据进行配对 t 检验及 Bland-Altman 分析。2 组数据进行配对 t 检验的前提条件: 2 组数据及 2 组数据差值符合正态性分布; 2 组数据进行 Bland-Altman 分析的前提条件: 2 组数据符合正态性分布及方差齐性, 2 组数据差值具有随机性且同时符合正态性分布。正态性分布检验: 当 $P \geq 0.05$ 时, 符合正态性分布, 当 $P < 0.05$ 时, 不符合正态性分布; 方差齐性分析: 当 $P \geq 0.05$ 时, 方差齐同; 当 $P < 0.05$ 时, 方差不齐; 以中位数为检验值, 进行游程检验: 当 $P \geq 0.05$ 时, 差值具有随机性; 当 $P < 0.05$ 时, 差值不具有随机性。以上正态性分布及方差齐性分析采用 Minitab 21 软件, 游程检验采用 SPSS13.0 软件。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法的验证

2.1.1 系统适用性 3 次测定右旋糖酐 20 样品峰及系列葡聚糖对照品峰 T 均在葡萄糖峰与右旋糖酐 D2000 峰 T 之间,理论塔板数按葡萄糖峰计算均大于 5 000,符合药典法“分子量及其分布”系统适用性要求,见表 1。

表 1 系统适用性验证结果

品类	T(min, min, min)	葡萄糖峰 理论塔板数
右旋糖酐 D2000	10.985 ^a , 10.974 ^b , 10.978 ^c	—
葡聚糖 Mw 667 800	12.866 ^a , 12.854 ^b , 12.824 ^c	—
葡聚糖 Mw 409 800	13.312 ^a , 13.329 ^b , 13.314	—
葡聚糖 Mw 273 000	13.771 ^a , 13.756 ^b , 13.738 ^c	—
葡聚糖 Mw 147 600	14.397 ^a , 14.385 ^b , 14.382 ^c	14 550 ^a
葡聚糖 Mw 80 900	15.127 ^a , 15.137 ^b , 15.114 ^c	14 828 ^b
葡聚糖 Mw 46 800	15.920 ^a , 15.900 ^b , 15.898 ^c	14 872 ^c
葡聚糖 Mw 23 800	17.017 ^a , 16.979 ^a , 16.997 ^c	—
葡聚糖 Mw 11 600	18.276 ^a , 18.255 ^c , 18.265 ^d	—
葡聚糖 Mw 5 220	19.134 ^a , 19.093 ^b , 19.110 ^c	—
葡聚糖 Mw 1 270	20.156 ^a , 20.131 ^b , 20.147 ^c	—
右旋糖酐 20 样品	17.182 ^a , 17.182 ^b , 17.165 ^c	—

注:—表示无此项;^a 为第 1 次测定结果;^b 为第 2 次测定结果;^c 为第 3 次测定结果。

2.1.2 标准曲线 标准曲线拟合方程为: $MW = -0.001\ 084\ 12T^4 + 0.064\ 523\ 1T^3 - 1.419\ 36T^2 + 13.363T - 39.082\ 6$, 决定系数(r^2) = 0.999 847。

2.1.3 专属性 样品溶液无其他色谱峰干扰且流动相在右旋糖酐 20 色谱峰 T 处不出峰,表明专属性良好,见图 1。

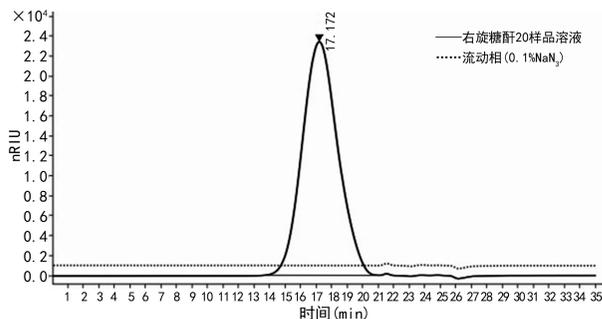


图 1 新建方法图谱

2.1.4 准确度 6 份葡聚糖分子量对照品溶液(Mw 为 23 800)的回收率处于 99.2%~100.5%;以右旋糖酐 20 样品厂家标示值为标准值(Mw 为 22 976),6 份右旋糖酐 20 样品的回收率处于 98.1%~99.4%,见表 2。

2.1.5 重复性 6 份右旋糖酐 20 样品 Mw 测定结果的 RSD 为 0.52%、10%大分子部分 Mw 测定结果的 RSD 为 0.59%、10%小分子部分 Mw 测定结果的 RSD 为 0.75%,见表 3。

表 2 葡聚糖分子量对照品及样品准确度验证结果

测试次数	葡聚糖对照品		右旋糖酐 20	
	测定值	回收率(%)	测定值	回收率(%)
1	23 911	100.5	22 690	98.8
2	23 542	98.9	22 554	98.2
3	23 623	99.3	22 747	99.0
4	23 602	99.2	22 713	98.9
5	23 856	100.2	22 849	99.4
6	23 898	100.4	22 544	98.1

表 3 重复性验证结果

测试次数	Mw	10%大分子部分		10%小分子部分	
		Mw	Mw	Mw	Mw
1	22 690	58 268	4 324		
2	22 554	58 100	4 260		
3	22 747	58 579	4 323		
4	22 713	58 438	4 318		
5	22 849	58 763	4 360		
6	22 544	57 805	4 321		

2.1.6 耐用性 3 次右旋糖酐 20 样品 Mw 测定结果分别为 22 690、22 510、22 828, RSD 为 0.70%, 10%大分子部分 Mw 测定结果分别为 58 268、57 978、58 725, RSD 为 0.65%, 10%小分子部分 Mw 测定结果分别为 4 324、4 283、4 354, RSD 为 0.82%, 说明不同批次流动相对右旋糖酐 20 样品分子量及其分布测定无影响。

2.1.7 样品溶液稳定性 0、6、9、24 h 及 30 h 测定的右旋糖酐 20 样品 Mw 分别为 22 544、22 527、22 519、22 339、22 510, 10%大分子部分 Mw 分别为 57 805、58 006、58 081、57 578、57 978, 10%小分子部分 Mw 分别为 4 321、4 289、4 285、4 228、4 283。将 6、9、24 h 及 30 h 测定结果与 0 h 测定结果进行比较, Mw 的 CV 值分别为 0.05%、0.08%、0.65%、0.11%, 10%大分子部分 Mw 的 CV 值分别为 0.25%、0.34%、0.28%、0.21%, 10%小分子部分 Mw 的 CV 值分别为 0.53%、0.59%、1.54%、0.62%, 说明样品溶液制备后于 2~8 °C 下放置 24 h 内稳定。

2.2 方法的初步应用 经测定, 3 批丹麦 Pharmacosmos 公司生产的右旋糖酐 20 样品出峰完整, 无 Na₂SO₄ 干扰, 且右旋糖酐 20 样品 Mw、10%大分子部分 Mw 及 10%小分子部分 Mw 测定结果均符合药典法中“Mw 为 16 000~24 000, 10%大分子部分 Mw 不得大于 70 000, 10%小分子部分 Mw 不得小于 3 500”的要求, 见表 4。

表 4 方法的初步应用结果

批次	M _w	10%大分子部分		10%小分子部分	
		M _w	M _w	M _w	M _w
DG603	22 463	57 883	4 270		
DR4111	22 681	59 185	4 266		
DT315	22 693	59 143	4 276		

2.3 方法一致性考察 分别采用药典法及本研究方法进行测定结果见表 5。经数据行为分析,可采用配对 *t* 检验及 Bland-Altman 分析进行方法等效统计比较,即右旋糖酐 20 样品 M_w、10%大分子部分 M_w 及 10%小分子部分 M_w 采用 2 种方法测定的数据符合正态性分布及方差齐性,2 种方法测定的数据间的差值具有随机性的同时符合正态性分布,数据行为良好。

经配对 *t* 检验,2 种方法测定右旋糖酐 20 M_w 与 10%大分子部分 M_w 结果比较,差异无统计学意义(右旋糖酐 20 M_w *P* = 0.457,10%大分子部分 M_w *P* = 0.092),而 10%小分子部分 M_w 结果比较,差异有统计学意义(*P* < 0.001);进行 Bland-Altman 分析,见图 2~4,2 种方法测定右旋糖酐 20 M_w、10%大分子部分 M_w 及 10%小分子部分 M_w 结果的差值均在

差值平均值的 95%置信区间内,即 2 种方法测定结果的一致性良好。

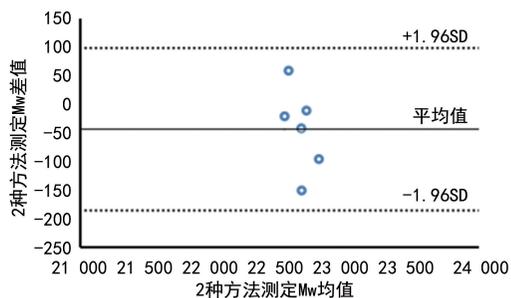


图 2 2 种方法右旋糖酐 20 Mw Bland-Altman 分析结果

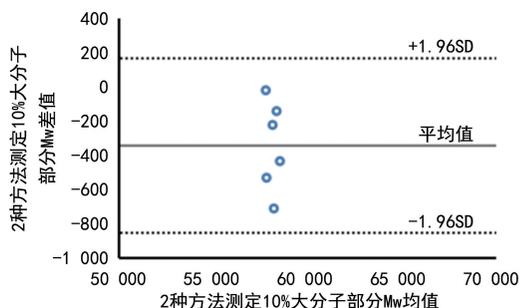


图 3 2 种方法 10%大分子部分 Mw Bland-Altman 分析结果

表 5 2 种方法右旋糖酐 20 Mw 及其分布测定结果

测试次数	M _w		10%大分子部分 Mw		10%小分子部分 Mw	
	新建方法	药典法	新建方法	药典法	新建方法	药典法
1	22 690	22 647	58 268	58 042	4 324	4 414
2	22 554	22 532	58 100	57 565	4 260	4 392
3	22 747	22 595	58 579	57 864	4 323	4 395
4	22 713	22 701	58 438	58 293	4 318	4 415
5	22 849	22 752	58 763	58 325	4 360	4 461
6	22 544	22 602	57 805	57 782	4 321	4 428

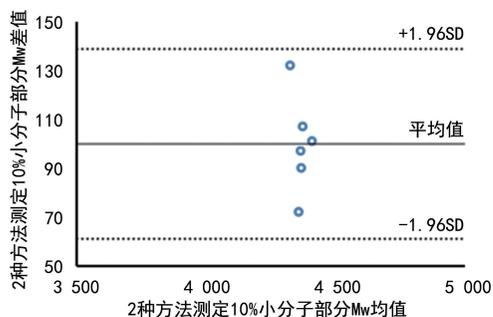


图 4 2 种方法 10%小分子部分 Mw Bland-Altman 分析结果

3 讨 论

A 型肉毒毒素的活性成分为 A 型肉毒结晶毒素,其实质为一种毒素蛋白^[2-3]。经研究表明,蛋白质在

冷冻干燥及贮藏过程中引起的变性可通过加入适量的右旋糖酐 20 来改善,原理为:右旋糖酐 20 可提高蛋白质分子的玻璃化温度,进一步阻止制品塌陷引起的蛋白质变性^[4-6]。因此,注射用 A 型肉毒毒素在研发阶段选择右旋糖酐 20 作为冻干保护剂,但由于右旋糖酐 20 自身具有强抗原性,进入机体可能会引起较强的过敏反应,从而引起皮肤瘙痒、恶心呕吐、休克甚至死亡^[7-9],故应对其品质进行严格把控。

药典法影响右旋糖酐 20 中 10%小分子部分 Mw 的准确检测,为实现对右旋糖酐 20 更加严格的品质把控,本研究对药典法进行了优化。在方法优化前期,作者查阅资料发现,Na₂SO₄ 主要为流动相提供足够的离子强度,避免右旋糖酐 20 在色谱柱上的吸附,

使右旋糖酐 20 出峰完整。考虑到药典法中流动相中的另一成分 NaN_3 同样为离子化合物,故试图增大 NaN_3 浓度以替代 Na_2SO_4 在此实验中的作用,通过摸索发现当将 NaN_3 浓度增大到 0.1% 时,可实现预期效果。

本研究对新建方法进行专属性、准确度、重复性及耐用性验证,验证结果均符合预定标准。

在进行方法一致性评价时,由于 Bland-Altman 方法具备分析直观、结果可靠、易于理解的优点,在医学临床研究方法一致性评价中得到广泛的应用^[10-13]。经过分析,该方法与药典法测定结果具有差值随机性、方差齐同、正态性分布的特点,可进行差值 Bland-Altman 方法分析^[14]。当进行 Bland-Altman 分析时,右旋糖酐 20 样品 M_w 、10% 大分子部分 M_w 及 10% 小分子部分 M_w 测定结果一致性良好。

将新建方法与药典法测定结果进行配对 t 检验,右旋糖酐 20 M_w 及 10% 大分子部分 M_w 结果比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 10% 小分子部分 M_w 结果比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),考虑到右旋糖酐 20 分子量及其分布测定原理(分子排阻色谱法:色谱柱的填充剂为表面分布着不同尺寸孔径的葡聚糖凝胶,药物分子根据分子大小进入色谱柱的葡聚糖凝胶孔内,进一步根据分子大小依次被洗脱^[15]),推断 10% 小分子部分 M_w 检测结果差异有统计学意义,是与 Na_2SO_4 峰对右旋糖酐 20 出峰峰尾产生的干扰有关。

经文献查阅,于栋伟等^[16]采用 HPLC-ELSD 法进行右旋糖酐分子量及其分布测定,ELSD 检测器检测原理复杂,需进行 3 个过程:雾化过程、蒸发过程及检测过程,操作复杂,且雾化过程需惰气,对检测环境要求高。本研究采用 HPLC-RID 法,RID 检测器为糖类分析常用检测器,对糖类物质灵敏度高、检测限低、操作简单且稳定性好。

综上所述,相比于药典方法与文献报道方法,新建方法对右旋糖酐 20 分子量及其分布测定具有更好的适用性,可实现对右旋糖酐 20 更加严格的品质把控。本研究亦可为药典法提供一定指导参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2020 年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:32-33.

[2] 何星,苗承辉,李小娟,等. 注射用 A 型肉毒毒素的生物学特性及质量分析[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(11):1488-1491.

[3] 安佳佳,付楚溪,汪建华,等. A 型肉毒毒素内肽酶免疫检测方法的建立[J]. 军事医学,2019,43(9):659-663.

[4] 孙东坡,胡一桥. 蛋白质冷冻干燥制品中的保护剂极保护机制[J]. 药学进展,2003,27(4):201-205.

[5] 刘莹. 人用狂犬病疫苗冻干保护剂筛选研究[J]. 生物化工,2018,4(3):40-42.

[6] 沈鸿伟,李明昊,徐南,等. 慢病毒载体冻干制剂的制备与稳定性研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2021,67(3):114-127.

[7] 程冬. 色谱柱及标准曲线的选择对 HPGPC 法测定右旋糖酐分子量及分子量分布的影响[J]. 药物分析杂志,2020,40(2):367-372.

[8] 康璧,帅维维,程冬. HPGPC-CAD 和 HPGPC-RID 测定右旋糖酐 40 分子量及分子量分布的方法比较[J]. 药物分析杂志,2021,41(11):1954-1959.

[9] 黎珍. 探究低分子右旋糖酐辅助治疗急性脑梗死的临床效果[J]. 临床医药文献杂志,2018,5(44):93-94.

[10] 周宇豪,许金芳,贺佳. 诊断试验一致性评价中几种方法的比较及应用[J]. 中国卫生统计,2011,28(1):40-42.

[11] 陈卉. Bland-Altman 分析在临床测量方法一致性评价中的应用[J]. 中国卫生统计,2007,24(3):308-309.

[12] 闻浩,陆梦洁. 定量测量 Bland-Altman 一致性评价方法研究及临床应用[J]. 医学研究生学报,2015,28(10):1107-1111.

[13] 李荣娟,苏武锦. Bland-Altman 分析法在临床检验方法比较的实例应用和绘图介绍[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(20):2727-2729.

[14] 萨建,刘桂芬. 定量测量结果的一致性评价及 Bland-Altman 法的应用[J]. 中国卫生统计,2011,28(4):409-411.

[15] 李蔷薇,李强,郑筠,等. HPGPC 法测定羧基麦芽糖铁重均分子质量和分子量分布[J]. 中国药房,2016,27(22):3066-3068.

[16] 于栋伟,李楠,孙燕,等. 高效分子排阻色谱-蒸发光散射检测法测定右旋糖酐分子量及其分布[J]. 苏州大学学报(医学版),2012,32(5):600-602.

(收稿日期:2023-10-19 修回日期:2023-12-21)