

- [2] ZHENG J F, ZHENG A L, GAI K. Determination of paeoniflorin in Guanxinkang granules by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2011, 25(4): 377-378, 381.
- [3] ZHANF X M, HE X Y. Study on quality standard for Guanxinkang granules [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2010, 24(4): 380-382.
- [4] WANG Z S, HAN G R, GAO F, et al. Rapid TLC identification and simultaneous determination of stilbene glucoside and salianolic acid B for Guidan Shaji capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(8): 886-889.
- [5] LI Y, GUO Z T, GONG X C, et al. Simultaneous determination of danshensu, hydroxysafflor yellow A, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B in water extract of mixed *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma Carthami Flos* by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(11): 1653-1656
- [6] YAN G Y, DONG J N, YANG Y, et al. Simultaneous determination of six components in Xinnaokang capsules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(8): 1672-1675.
- [7] JIA X. Determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and cryptotanshinone in Niasai Tong tablets by HPLC [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2014, 29(1): 77-79.
- [8] WANG Y Z. Simultaneous determination of paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and ferulic acid in Xielong Liquor by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(10): 1925-1928.
- [9] 王彦英, 申玲玲, 杜光. 丹参舒心胶囊中丹酚酸 B 的含量测定[J]. 医药导报, 2013, 32 (3): 375-377.
- [10] XU Z S, ZAI B C, ZHANG X. Research of the stability of ferulic acid in *Rhizoma Chuanxiong* [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2004, 18(2): 25-27.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2010: 38, 124.

收稿日期: 2014-11-16

HPCE 与 HPLC 测定科博肽注射液含量的方法比较

胡亦沁¹, 李元圆², 徐骏军¹, 李范珠^{1*} (1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省医药高等专科学校, 杭州 310053)

摘要: 目的 系统地比较高效毛细管电泳法(HPCE)和高效液相色谱法(HPLC)在测定科博肽注射液含量方面的差异。方法 HPCE 分离条件为: 未涂层毛细管柱(50 $\mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$, 有效长度 30 cm), 运行缓冲液为 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 2.5), 分离电压 20 kV, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 200 nm; HPLC 分离条件为: Aeris PEPTIDE XB-C₁₈ 柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.6 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 200 nm, 流动相 A: 0.1% 三氟乙酸-水、流动相 B: 0.1% 三氟乙酸-乙腈, 梯度洗脱。结果 科博肽在 HPLC 和 HPCE 各自的分离条件下进样浓度分别在 17.33~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1.08~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内表现出良好的线性关系(r 均为 0.999 7), 平均加样加收率分别为 100.3%和 99.3%, RSD 分别为 0.7%和 1.2%。结论 HPCE 与 HPLC 均可用于科博肽注射液的含量测定, 但 HPCE 在使用成本、分离时间、检出限等方面更具有优势。

关键词: 高效毛细管电泳法; 高效液相色谱法; 科博肽

中图分类号: R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)05-0564-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.011

Comparison of Determination of Cobratide Injection by HPCE and HPLC

HU Yiqin¹, LI Yuanyuan², XU Junjun¹, LI Fanzhu^{1*} (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare HPCE method and HPLC method for determining the content of Cobratide injection. **METHODS** In HPCE analysis, an uncoated fused silica capillary(50 $\mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$, effective length 30 cm) was used, with 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer(pH=2.5) as the running buffer under the voltage of 20 kV at 25 $^{\circ}\text{C}$, and the detection wavelength was 200 nm. In HPLC method, the separation was performed on an Aeris PEPTIDE XB-C₁₈ column(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.6 μm) under the temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$ with 0.1% TFA-H₂O and 0.1% TFA-CH₃CN as the mobile phase at flow rate of 0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detection wavelength was set at 200 nm. **RESULTS** The linear range of HPLC and HPCE were 17.33~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 7$) and 1.08~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 7$), respectively. Their average recoveries were 100.3% and 99.3% with RSD of 0.7% and 1.2%, relatively. **CONCLUSION** Both methods can be applied to determine the content of Cobratide injection, but

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274089, 81473361)

作者简介: 胡亦沁, 女, 硕士生 Tel: (0571)86633030 E-mail: qqb702@163.com

*通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授 Tel:

(0571)86633030 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

HPCE earns more benefits on shorter separation time and lower detection limit and cost.

KEY WORDS: HPCE; HPLC; cobratide

科博肽是从中华眼镜蛇(*Naja atra*)^[1]毒液中分离的短链神经毒素多肽。科博肽主要作用于中枢^[2]，具有良好的镇痛作用，且无胃肠道不良反应，无耐受性和成瘾性，其效价强度比同等剂量的吗啡高数十倍，镇痛效果比吗啡持久，是一种新型的替代性镇痛药物，临床主要用于治疗癌痛和各种慢性、顽固性疼痛等，具有良好的应用前景。目前文献报道的科博肽含量测定方法主要为高效液相色谱法(HPLC)^[3]，但此方法分离度差^[4]，色谱柱寿命低，成本高，耗时长。高效毛细管电泳(HPCE)与 HPLC 相比，具有高灵敏度、操作简便、成本低廉等诸多优点，近年来被广泛应用于蛋白质、多肽等生物大分子的分析分离^[5-7]。本实验分别建立了科博肽的 HPCE 和 HPLC 含量测定方法，并对其色谱条件、分离效果、检测限、测定结果等进行比较，探讨 2 种方法在科博肽注射液含量测定方面的优劣。

1 仪器与试剂

BECKMAN P/ACE MDQ 型高效毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司，UV 检测器)；Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司，DAD 检测器)；未涂层石英毛细管柱(50 $\mu\text{m} \times 40 \text{ cm}$ ，有效长度 30 cm，河北永年锐沣色谱器件有限公司)；32 Karat 色谱工作站；CP225D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)；Five Easy TM pH 计(瑞士 Mettler toledo 公司)。

科博肽对照品(云南龙凤谷生物药业有限公司，批号：20131205，纯度 $\geq 97\%$)；科博肽注射液(云南南诏药业，批号：20120101，20121101，20130901；规格：2 mL : 70 μg)；CEofixTM NTMP 试剂盒(北京博思雅生化技术研究院)；乙腈(美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司，色谱纯)；水为双蒸水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 实验条件

2.1.1 电泳条件 缓冲液: 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 2.5)；分离电压: 20 kV；温度: 25 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长: 200 nm。进样条件: 采用压力进样，6 894.65 Pa，10 s。每次进样前用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液冲洗 2 min，纯水冲洗 2 min，最后用运

行缓冲液冲洗毛细管柱 2 min，分析结束后用氢氧化钠溶液和水各冲洗 5 min。

2.1.2 色谱条件 色谱柱: 菲罗门 Aeris PEPTIDE XB-C₁₈(4.6 mm $\times$ 150 mm, 3.6 μm)；流动相 A: 0.1% TFA-水，流动相 B: 0.1% TFA-乙腈；梯度洗脱: 0 min, 10% B; 10 min, 27% B; 12 min, 10% B; 13 min, 10% B；流速: 0.9 mL·min⁻¹；检测波长: 200 nm；进样量: 20 μL ；柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取科博肽对照品 1.98 mg，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得科博肽对照品储备液(浓度为 198 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 供试品溶液的制备

取科博肽注射液，即得。

2.4 线性关系、检测限及定量限考察

HPCE: 精密吸取对照品储备液适量，加水配成每 1 mL 含科博肽 1.08, 4.33, 8.66, 17.33, 34.65, 69.30, 138.60 μg 的系列浓度对照品溶液，分别进样。以对照品浓度(X)为横坐标，峰面积(Y)为纵坐标进行回归，得回归方程为: $Y=1\ 312.1X-1\ 271.3$ ， $r=0.999\ 7$ 。结果表明，科博肽在 1.08~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系。以信噪比 10 : 1 ($S/N=10$)确定科博肽的定量限为 0.37 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，以信噪比 3 : 1 ($S/N=3$)确定科博肽的检测限为 0.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=3$)，定量限 RSD 为 1.7%，检测限 RSD 为 1.8%。

HPLC: 精密吸取对照品储备液适量，加水配成每 1 mL 含科博肽 17.33, 34.65, 69.30, 97.02, 138.60 μg 系列浓度的对照品溶液，分别进样。以对照品浓度(X)为横坐标，峰面积(Y)为纵坐标进行回归，得回归方程为: $Y=41\ 974X+18\ 818$ ， $r=0.999\ 7$ 。结果表明，科博肽在 17.33~138.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好线性关系。以信噪比 10 : 1 ($S/N=10$)确定科博肽的定量限为 14.43 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，以信噪比 3 : 1 ($S/N=3$)确定科博肽的检测限为 7.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=3$)，定量限 RSD 为 1.5%，检测限 RSD 为 1.5%。

2.5 精密度试验

取对照品溶液(34.65 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，按“2.1”项下的电泳和色谱条件，分别连续进样 5 次，测定日内精密度，以峰面积计算 RSD 为 1.1%和 0.9%。

表明 2 种分析条件下仪器精密度良好。取上述对照品溶液测定 3 d, 每天测定 5 次, 测定日间精密度, 以峰面积计算 RSD 为 1.4%和 1.4%。表明 2 种方法精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批号的供试品溶液(批号: 20121101), 按“2.1”项下的电泳和色谱条件分别重复进样 6 次, 以峰面积计算 RSD 为 1.7%和 1.2%。表明 2 种方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号: 20121101), 按“2.1”项下的电泳和色谱条件, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 以峰面积计算 RSD 为 1.7%和 1.0%。说明注射液开启安瓿瓶后在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验

精密量取科博肽注射液 0.5 mL, 置 1 mL 量瓶中, 精密加入一定量的对照品溶液, 加水至刻度, 摇匀, 按“2.1”项下的电泳和色谱条件分别进样测定, 计算回收率, 结果 HPCE 和 HPLC 的加样回收率分别为 99.3%和 100.3%, 见表 1 和表 2。

表 1 毛细管电泳回收率试验结果(n=9)

Tab. 1 Recovery of Cobratide by HPCE (n=9)

样品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
18.41	13.86	32.14	99.06		
18.41	13.86	32.30	100.22	99.5	0.62
18.41	13.86	32.17	99.28		
18.34	20.79	38.65	97.69		
18.34	20.79	39.44	101.49	99.6	1.91
18.34	20.79	39.05	99.62		
18.25	27.72	45.36	97.80		
18.25	27.72	45.87	99.64	98.9	0.99
18.25	27.72	45.77	99.28		

表 2 高效液相回收率试验结果(n=9)

Tab. 2 Recovery of Cobratide by HPLC(n=9)

样品量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
18.97	13.86	33.07	101.73		
18.97	13.86	32.93	100.72	100.9	0.80
18.97	13.86	32.85	100.14		
18.74	20.79	39.35	99.13		
18.74	20.79	39.49	99.81	99.0	0.83
18.74	20.79	39.15	98.17		
18.78	27.72	46.66	100.58		
18.78	27.72	46.97	101.70	101.1	0.56
18.78	27.72	46.79	101.05		

2.9 样品含量测定

取 3 个批号的市售科博肽注射液(标示量: 2 mL : 70 μg), 按“2.1”项下的电泳和色谱条件, 分别进样测定, 外标法计算含量。结果见表 3。对照品和供试品电泳图和色谱图见图 1 和图 2。

表 3 含量测定结果(n=3)

Tab. 3 Results of content determination (n=3)

检测方法	批号	科博肽含量/μg·mL ⁻¹
HPCE	20120101	36.68
	20121101	36.82
	20130901	36.50
HPLC	20120101	37.56
	20121101	37.93
	20130901	37.47

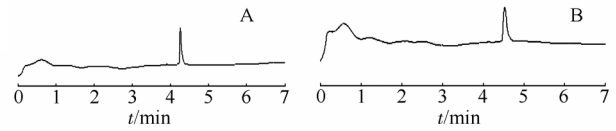


图 1 科博肽对照品(A)、注射液供试品(B)的 HPCE 图
Fig. 1 HPCE chromatograms of the standard cobratide(A) and its injection sample(B)

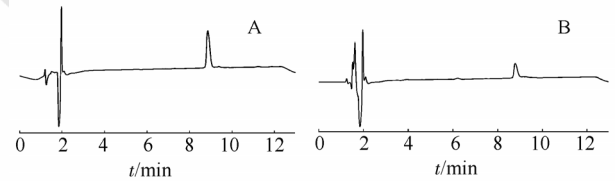


图 2 科博肽对照品(A)、注射液供试品(B)的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of the standard cobratide(A) and its injection sample(B)

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取科博肽对照品在 190~400 nm 内进行全波长扫描, 发现其在 200 nm 处有最大吸收。科博肽在 200 nm 处基线平稳, 基本无背景干扰。故选择 200 nm 为检测波长。

3.2 HPCE 电泳条件的选择

本实验分别考察了硼砂溶液、磷酸盐溶液和 CEofix™ NTMP 试剂盒 3 个缓冲液体系。科博肽在硼砂溶液中不出峰, 而在试剂盒和磷酸盐缓冲液中分离效果良好。蛋白质、多肽易对毛细管壁产生吸附作用, 从而影响毛细管电泳分离效率及重复性, 通过改变缓冲液 pH 值, 采用极端 pH 值

法可有效抑制管壁的吸附^[8],且磷酸盐缓冲液可以达到和 CEofix™ NTMP 试剂盒相同的分离效果,故本实验选用磷酸盐缓冲液为分离介质,并调节其 pH 至 2.5。

提高分离电压可以缩短分析时间,提高柱效。但电压过高会产生较大的焦耳热,影响柱效,并且由于迁移速度加快而降低分离度。本实验考察了 10~30 kV 电压时科博肽的分离情况。电压为 20 kV 时,科博肽分离时间短,分离效果好且峰形良好,故选择 20 kV 为分离电压。

柱温直接影响电解质溶液的黏度、离子淌度、谱带扩展。本实验分别考察了 15, 20, 25, 30 °C 时科博肽的分离情况。随柱温升高,科博肽迁移时间缩短,电流也相应增大,柱效降低。因此,综合考虑选择 25 °C 作为实验柱温。

3.3 HPLC 色谱条件的选择

多肽的 HPLC 分离常多采用磷酸缓冲盐体系和水-乙腈体系作为流动相,本实验考察了这 2 种体系测定科博肽的分离效果。科博肽在磷酸缓冲盐体系中无法正常出峰,以乙腈-水(三氟乙酸)等度洗脱分离效果不理想,梯度洗脱可得到较好分离效果。加入少量三氟乙酸可改善峰形,消除拖尾,故选择水-乙腈-三氟乙酸的流动相体系,对科博肽进行分离测定。

3.4 HPCE 与 HPLC 测定科博肽注射液的比较及体内应用

本实验对 HPCE 和 HPLC 2 种方法测定科博肽注射液进行比较。大分子蛋白多肽药物结构具有特殊性,直接采用 HPLC 进行检测往往不能满足其测定需要。HPCE 以电场为驱动力,根据被测物的荷/质比差异进行分离,蛋白多肽类生物大分子扩散系数较小,具有高分辨率、高灵敏度等诸多优点。HPCE 与 HPLC 测定科博肽的检测限分别为 $0.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $7.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, HPCE 的灵敏度明显高于 HPLC。HPCE 与 HPLC 的分离时间分别为 4.5 min 和 9 min, HPCE 更为快速、高效。此外,HPCE 的样品及流动相用量远少于 HPLC,更适用

于体内样品的检测,且流动相不需使用有机溶剂,使用成本低廉。2 种分析方法含量测定的结果基本一致。由以上结果可知 HPCE 和 HPLC 均可用作科博肽注射液的含量测定,但 HPCE 较 HPLC 具有明显优势。

大鼠肌肉注射科博肽注射液,取血浆离心后,按“2.1”项下的电泳和色谱条件进样分析。在 HPLC 色谱条件下无法检测到体内的科博肽;在 HPCE 色谱条件中,大鼠血浆对科博肽的分离无干扰,专属性良好。HPCE 可以检测到体内低浓度的科博肽,但浓度 $<0.11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 则无法检测到。对于更低浓度的科博肽样品,可考虑通过荧光衍生化反应,应用高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测法(HPCE-LIF)提高其检测限进行分离分析。

本实验建立了科博肽的 HPCE 和 HPLC 含量测定方法,为科博肽体内样品的测定奠定了基础。

REFERENCES

- [1] TSETLIN V. Snake venom alpha-neurotoxins and other three-finger proteins [J]. Eur J Biochem, 1999, 264(2): 281-286.
- [2] CHEN R Z, WU X R. The analgesic action of cobra neurotoxin [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 1988, 4(2):113-116.
- [3] LUO Z D, FENG Y Y. Research on determination of the content of cobratide [J]. Chin J Drug Eval(中国药物评价), 2013, 30(4): 207-209.
- [4] CHENG S Y, LE J J, LI J, et al. Study on methods and establishment for reference standard of cobratide [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(8): 1212-1214.
- [5] FLEURBAIJ F, HEEMSKERK A A, RUSSCHER A, et al. Capillary-electrophoresis mass spectrometry for the detection of carbapenemases in (multi-)drug-resistant gram-negative bacteria [J]. Anal Chem, 2014, 86(18): 9154-9161.
- [6] MEDINA-CASANELLAS S, TAK Y H, BENAVENTE F, et al. Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid [J]. Electrophoresis, 2014, 35(20): 2996-3002.
- [7] CHEN Y, XU L, LIN J, et al. Assay of bradykinin-related peptides in human body fluids using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. Electrophoresis, 2008, 29(6): 1302-1307.
- [8] LIU H, WANG Y M. Application of polymer coating for protein separation by capillary electrophoresis [J]. Chin Polymer Bull(高分子通报), 2007(7): 17-23.

收稿日期: 2014-12-12