

附件1

人促红素注射剂原液唾液酸含量测定 扩大验证实验方案（草案）

一、仪器设备、试剂及耗材

（一）主要仪器设备

1. 高效液相色谱仪（HPLC，配有荧光检测器）。
2. 其他仪器：不锈钢水浴锅（可加热到 $80\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、离心机（可达到13500g及以上）、涡旋振荡器。

（二）关键试剂

1. 4,5-亚甲二氧基-1,2-苯二胺二盐酸盐(DMB)(sigma或其他等效)。
2. 2-巯基乙醇。
3. 连二亚硫酸钠。

（三）主要耗材

1. C18色谱柱（ $3\mu\text{m}$, $4.6\text{mm}\times 150\text{mm}$ 或等效的色谱柱）。
2. 0.5 ml Eppendorf离心管。

二、实验样品

（一）对照品

N-乙酰神经氨酸对照品（Neu5Ac）和N-羟乙酰神经氨酸对照品（Neu5Gc）（USP或sigma或其他等效）。

（二）人促红素原液

企业自备（至少3批，且必须涵盖不同效期）。

三、实验方法

照高效液相色谱法（通则0512）测定。

试剂 （1）醋酸溶液：取冰醋酸12g，加水至100ml，混匀。

（2）衍生溶液（避光操作）：取水 1.5ml、冰醋酸 172 μ l 和 2-巯基乙醇 112 μ l，混匀，加称取的连二亚硫酸钠 4.9mg，使溶解；精密称取 4,5-亚甲二氧基-1,2-苯二胺二盐酸盐（DMB）3.5 mg，加入上述溶液，加水 200 μ l 使溶解。

对照品溶液 取N-乙酰神经氨酸（Neu5Ac）约10mg，精密称定，置10ml量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，作为贮备液（1）；取N-羟乙酰神经氨酸（Neu5Gc）约10mg，精密称定，置250ml量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，作为贮备液（2）；精密量取贮备液（1）和贮备液（2）各4ml，置250 ml量瓶中，用醋酸溶液稀释至刻度，作为混合对照品贮备液。

精密量取混合对照品贮备液0.4ml、0.8ml、2ml、4ml、8ml，分别置10ml量瓶中，用醋酸溶液稀释至刻度。精密量取以上溶液各200 μ l，80℃孵育2～2.5小时，放冷。分别精密量取5 μ l，各加入精密量取的衍生溶液20 μ l，涡旋混匀，50℃避光孵育3小时，精密加水475 μ l终止反应，作为对照品溶液（1）～（5）。

供试品溶液 取蛋白质含量为1～3mg/ml的人促红素原液400 μ l，置10kD超滤离心管中，不低于13500g离心10分钟，弃去下层溶液。10kD超滤离心管中加水300 μ l，不低于13500g离心10分钟，弃去下层溶液，重复操作两次。取截留的上层溶液用适宜方法测

定蛋白质含量，用醋酸溶液稀释至适宜浓度（含蛋白质约0.2mg，含Neu5Ac约为10～20μmol/L），取200μl置80℃孵育2～2.5小时，放冷，精密量取5μl，加精密量取的衍生溶液20μl，涡旋混匀，50℃避光孵育3小时，精密加水475μl终止反应并混匀。

空白溶液 精密量取醋酸溶液200μl，自供试品溶液方法项下“置80℃孵育2～2.5小时”起，同法制备。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱（4.6mm×150mm，3μm，或等效的色谱柱），柱温为30℃；以乙腈-甲醇-水（9:7:84）为流动相A，以乙腈为流动相B，按下表进行梯度洗脱，流速为每分钟0.5 ml；荧光检测器，激发波长为373nm，发射波长为448nm；样品室温度为2～8℃，进样体积为25μl。

时间（分钟）	A 液（%）	B 液（%）
0.0	100	0
25.0	100	0
25.1	40	60
30.0	40	60
30.1	100	0
35.0	100	0

系统适用性要求 空白溶液色谱图中应无干扰峰；

对照品溶液（3）色谱图中Neu5Ac峰和Neu5Gc峰之间的分离度应不小于2.0，重复进样Neu5Ac和Neu5Gc峰面积的相对标准偏差（RSD）均应不大于5%（n=6）；对照品溶液（1）色谱图中Neu5Gc峰的信噪比应不小于10；

以对照品溶液（1）～（5）中Neu5Ac和Neu5Gc浓度分别对其

对应的峰面积计算线性回归方程，相关系数(r)均应不小于0.99。

测定法 精密量取空白溶液、对照品溶液(1)~(5)与供试品溶液，依序注入液相色谱仪，顺序为空白溶液(进样1针)、对照品溶液(3)(进样6针)、空白溶液、对照品溶液(1)~(5)、供试品溶液1、供试品溶液2.....对照品溶液(3)(进样1针)，记录色谱图。

以对照品溶液(1)~(5)中Neu5Ac和Neu5Gc的浓度对其对应的峰面积，分别求得Neu5Ac和Neu5Gc线性回归方程，分别计算供试品溶液中Neu5Ac和Neu5Gc的浓度，再按下式计算供试品中唾液酸(Neu5Ac或Neu5Gc)含量。1mg Neu5Ac相当于3.24μmol, 1mg Neu5Gc相当于3.08μmol。

$$\text{唾液酸含量}(\text{mol/mol人促红素}) = \frac{A}{P/W} \times n \times 10^{-3}$$

公式中 A为供试品溶液中Neu5Ac或Neu5Gc的浓度(μmol/L)

P为供试品溶液中人促红素蛋白质含量(mg/ml)

W为每1μmol人促红素蛋白质的量，相当于30.6mg

n为供试品稀释倍数

注意事项 (1) 荧光检测器的增益可进行调节，以获得合适的信号响应强度。

(2) 可采用优级纯试剂制备衍生溶液以避免产生干扰。该溶液可在-20℃条件暗处保存一年。衍生溶液也可采用经验证的商品化试剂盒。

(3) Neu5Ac和Neu5Gc均在0.04~40μmol/L浓度范围内，分别与其相应的峰面积呈良好线性。在线性范围内，可根据供试品中

Neu5Ac和Neu5Gc的含量制备适宜浓度的对照品溶液(1)~(5)。

(4) 如供试品中唾液酸含量较低，加水超滤换液后也可用4mol/L醋酸溶液进行稀释以保证供试品溶液中醋酸溶液的终浓度为2mol/L。

(5) 唾液酸除常见的Neu5Ac和Neu5Gc外，还包括O-乙酰化的唾液酸 (Neu5,7Ac₂、Neu5Gc,9Ac、Neu5,8Ac₂、Neu5,9Ac₂、Neu5,x,xAc₃)，详见图1。本法可同时分离检测7种唾液酸结构，详见图2。按面积归一化法，可计算供试品中各唾液酸占总唾液酸 (7种唾液酸) 的含量。若需要检测去O-乙酰化的Neu5Ac和Neu5Gc总量 (包括5位氨基和4、7、8、9位的羟基发生取代)，可在唾液酸释放之前进行去O-乙酰化处理 (在供试品中加入10%体积的1mol/L氢氧化钠溶液，放置30分钟后，再加入10%体积的1mol/L盐酸溶液终止反应)。

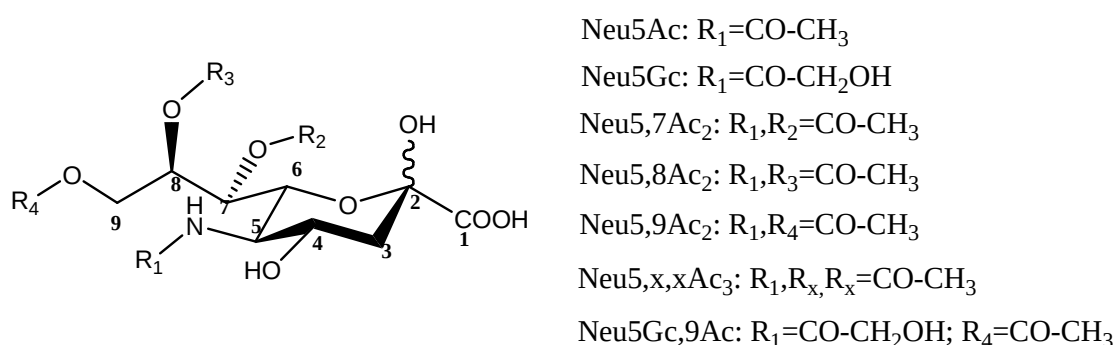


图1 唾液酸结构图

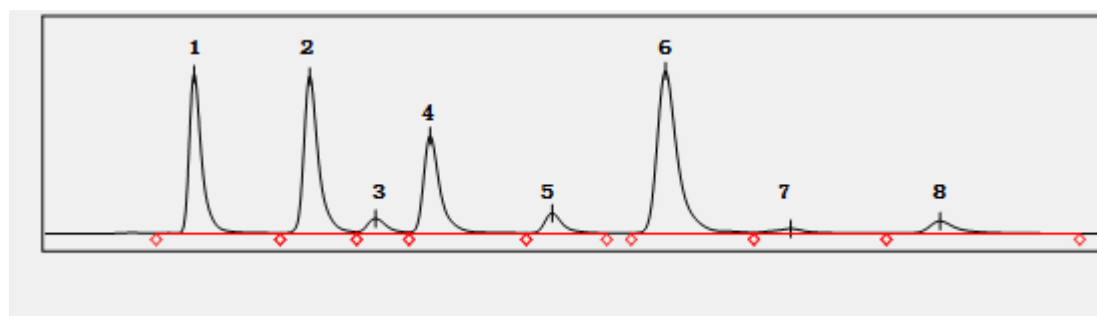


图 2 唾液酸混合对照品（包含 7 种唾液酸结构）液相图谱

1 Neu5Gc; 2 Neu5Ac; 3 Neu5,7Ac₂; 4 Neu5Gc,9Ac; 5 Neu5,8Ac₂; 6 Neu5,9Ac₂; 7 溶剂; 8 Neu5,x,xAc₃

四、验证方案

（一）样品测定

取供试品，按照“三、实验方法”进行测定。

（二）重复性试验

取供试品，一式六份制备，分别进样测定，计算 Neu5Ac 和 Neu5Gc 峰面积的相对标准偏差（RSD%）。

（三）准确性（回收率）试验

取供试品适量，加水超滤换液后用 2mol/L 醋酸溶液稀释至适宜浓度（含 Neu5Ac 约为 10 ~ 20 μmol/L）。取上述溶液 200 μl，分别与对照品溶液（2）、对照品溶液（3）、对照品溶液（4）各 200 μl 混匀，80℃ 孵育 2 ~ 2.5 小时，放至室温，同供试品溶液进行唾液酸的标记，制备高中低三个浓度的回收率溶液，每个浓度的回收率溶液制备 3 份。由直线回归方程计算 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的含量，并计算高中低三个浓度的回收率%及平均回收率%和 RSD%（n=9）。

（四）稳定性试验

供试品溶液，在 2 ~ 8℃ 下放置 0 ~ 72 小时，选择合适的时间点进样（进样次数 ≥ 6），计算多次进样 Neu5Ac 和 Neu5Gc 峰面积的相对标准偏差（RSD%），判断供试品溶液的稳定性。