



(21) 申请号 202410775102.4

(22) 申请日 2024.06.17

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118348183 A

(43) 申请公布日 2024.07.16

(73) 专利权人 原子高科股份有限公司

地址 100089 北京市海淀区厂洼中街66号1
号楼1层南部105室

(72) 发明人 吴福海 康肖梦 孙钰林 邢宇
李英

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

专利代理师 黄爽

(51) Int. Cl.

G01N 30/88 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111295184 A, 2020.06.16

US 4066742 A, 1978.01.03

审查员 袁琳

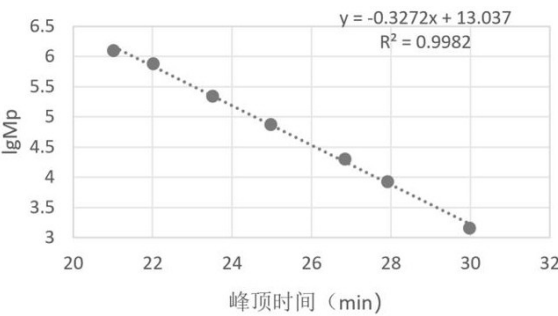
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明
胶分子量分布及其含量的方法

(57) 摘要

本发明涉及药物分析技术领域,提供一种凝
胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子
量分布及其含量的方法。本方法能够快速、准确
地使用一种分析方法同时检测明胶的分子量分
布和含量,有效监测硫化胶体冻干品的质量。本
方法有较好的专属性,在特定的色谱条件下,明
胶分子无剪切,能将硫化胶体冻干品中的明胶和
硫代硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠分离,准确检测
明胶的分子量分布及其含量,有效填补了该领域
技术空白。



1. 凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 配制分子量标准样品溶液: 分别称取不同峰顶分子量的标准样品至少5个, 所述标准样品的分子量均匀分布在1000-1500000之间, 分别加流动相制成浓度为2-10mg/mL的分子量标准样品溶液;

(2) 明胶用流动相配制成浓度为2-20mg/mL的明胶对照品溶液;

(3) 取硫化胶体冻干品加流动相溶解, 使其中明胶浓度为2-15mg/mL, 作为供试品溶液;

(4) 取所述分子量标准样品溶液、所述明胶对照品溶液和所述供试品溶液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 收集采集后的数据, 采用GPC软件处理数据, 得到硫化胶体冻干品中明胶的相对分子质量和相对分子质量的分布信息; 以外标法计算得到硫化胶体冻干品中明胶的含量;

步骤(2)~(3)中, 所述流动相为硝酸钠的盐溶液: 含有0.1-0.2mol/L硝酸钠, 0.01mol/L磷酸二氢钠, 0.007mol/L氢氧化钠和0.05%的ProClin 300抑菌剂;

步骤(4)包括如下子步骤:

1) 采用安捷伦1260高效液相色谱仪, 检测器为示差折光检测器; 采用Aglient GPC排阻色谱柱; 流动相为硝酸钠的盐溶液; 流速为0.8-1.2mL/min, 等度洗脱, 分析时间30-50分钟, 柱温25-35℃, 检测器温度40-50℃, 进样量5-20μL;

2) 分子量标准样品标准曲线的建立: 以各分子量标准样品溶液的出峰时间为横坐标, 峰顶分子量的对数值为纵坐标建立标准曲线;

3) 将明胶对照品溶液中明胶的出峰时间带入到分子量标准样品标准曲线中, 得到明胶的峰顶分子量, 进一步使用专业GPC色谱数据处理软件处理采集后的色谱图数据得到明胶的分子量及其分布的详细信息, 包括峰顶分子量、数均分子量、重均分子量、分子量分布系数、切片细节;

4) 将供试品溶液中明胶的出峰时间带入到分子量标准样品标准曲线中, 得到明胶的峰顶分子量, 进一步使用专业GPC色谱数据处理软件处理采集后的色谱图数据得到明胶的分子量及其分布的详细信息, 包括峰顶分子量、数均分子量、重均分子量、分子量分布系数、切片细节; 并根据明胶对照品峰面积, 计算出供试品中明胶的含量; 计算公式如下:

$$C_X = \frac{C_r \times A_x}{A_r};$$

其中: C_x 为供试品溶液浓度; C_r 为明胶对照品溶液浓度; A_x 为供试品峰面积; A_r 为明胶对照品峰面积;

子步骤1) 采用1-3根Aglient GPC排阻色谱柱串联使用, 色谱柱规格为8μm, 300mm×7.5mm;

子步骤1) 色谱柱前串联使用Aglient保护柱;

所述硫化胶体冻干品的成分包含明胶、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸二钠。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述标准样品选自聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚苯乙烯、葡聚糖、支链淀粉中的至少一种。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述标准样品为聚乙二醇和聚环氧乙烷。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 子步骤3) 和4) 中所述的专业GPC色谱数据处理软件为千谱HW-2000色谱工作站软件。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 步骤(1) 中称取不同峰顶分子量的聚乙二醇和聚环氧乙烷标准样品7个; 其中, 聚乙二醇标准样品的峰顶分子量分别为1470、8500、20180, 聚环氧乙烷标准样品的峰顶分子量分别为73650、219400、756500、1250000。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, 子步骤2) 所建标准曲线的相关方程为:

$y = -0.3272x + 13.037$, 相关系数R为0.999。

凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药物分析技术领域,具体地说,涉及凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法。

背景技术

[0002] 锝^[99mTc]硫化胶体注射液主要用于乳腺癌患者肿瘤引流区的淋巴结定位,是一种即时标记的诊断用放射性药品,锝^[99mTc]硫化胶体注射液由高锝^[99mTc]酸钠注射液和注射用硫化胶体药盒加热反应制得。注射用硫化胶体药盒中的硫化胶体冻干品,包括明胶、依地酸二钠(乙二胺四乙酸二钠)和硫代硫酸钠三种成分,其中明胶作为锝^[99mTc]的吸附包裹的载体,是锝^[99mTc]硫化胶体注射液制备的关键成分,明胶的分子量分布及其含量会影响后续锝^[99mTc]硫化胶体注射液的粒度及分布。锝^[99mTc]硫化胶体注射液在美国已上市多年,目前尚未在中国上市。中国药典、美国药典、日本药典和欧洲药典均未收录注射用硫化胶体药盒的质量标准。针对硫化胶体冻干品中明胶分子量分布或者其含量的检测研究,目前尚未见相关报道。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法。

[0004] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种凝胶渗透色谱法测定硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法,包括以下步骤:

[0005] (1) 配制分子量标准样品溶液:分别称取不同峰顶分子量(Mp)的标准样品至少5个,所述标准样品的分子量均匀分布在1000-1500000之间,分别加流动相制成浓度为2-10mg/mL(优选5mg/mL)的分子量标准样品溶液;

[0006] (2) 明胶用流动相配制成浓度为2-20mg/mL(优选5mg/mL)的明胶对照品溶液;

[0007] (3) 取硫化胶体冻干品加流动相溶解,使其中明胶浓度为2-15mg/mL(优选5mg/mL),作为供试品溶液;

[0008] (4) 取所述分子量标准样品溶液、所述明胶对照品溶液和所述供试品溶液分别注入液相色谱仪,记录色谱图,收集采集后的数据,采用GPC软件处理数据,得到硫化胶体冻干品中明胶的相对分子质量和相对分子质量的分布信息;以外标法计算得到硫化胶体冻干品中明胶的含量。

[0009] 步骤(2)~(3)中,所述流动相为硝酸钠的盐溶液:含有0.1-0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠和0.05%的ProClin 300抑菌剂。

[0010] 本发明中,所述标准样品可以选自聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚苯乙烯、葡聚糖、支链淀粉等中的至少一种。

[0011] 优选地,所述标准样品为聚乙二醇和聚环氧乙烷。

[0012] 更优选地,所述标准样品的数量为7个。

[0013] 进一步地,步骤(4)包括如下子步骤:

[0014] 1) 采用安捷伦1260高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器(RID);采用Aglient GPC排阻色谱柱;流动相为硝酸钠的盐溶液(含有0.1-0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠和0.05%的ProClin 300抑菌剂)。

[0015] 流速为0.8-1.2mL/min,等度洗脱,分析时间30-50分钟,柱温25-35℃,检测器温度40-50℃,进样量5-20μL。

[0016] 优选地,流速为1.0mL/min,等度洗脱,分析时间35分钟,柱温30℃,检测器温度40℃,进样量20μL。

[0017] 2) 分子量标准样品标准曲线的建立:以各分子量标准样品溶液的出峰时间(峰顶时间)为横坐标,峰顶分子量的对数值($\lg M_p$)为纵坐标建立标准曲线。

[0018] 3) 将明胶对照品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间)带入到分子量标准样品标准曲线中,得到明胶的峰顶分子量(M_p),进一步使用专业GPC色谱数据处理软件(如千谱HW-2000色谱工作站软件)处理采集后的色谱图数据得到明胶的分子量及其分布的详细信息,包括峰顶分子量(M_p)、数均分子量(M_n)、重均分子量(M_w)、分子量分布系数(M_w/M_n)、切片细节。

[0019] 4) 将供试品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间)带入到分子量标准样品标准曲线中,得到明胶的峰顶分子量(M_p),进一步使用专业GPC色谱数据处理软件(如千谱HW-2000色谱工作站软件)处理采集后的色谱图数据得到明胶的分子量及其分布的详细信息,包括峰顶分子量(M_p)、数均分子量(M_n)、重均分子量(M_w)、分子量分布系数(M_w/M_n)、切片细节;并根据明胶对照品峰面积,计算出供试品中明胶的含量;计算公式如下:

[0020] $C_x =$

[0021] 其中: C_x 为供试品溶液浓度; C_r 为明胶对照品溶液浓度; A_x 为供试品峰面积; A_r 为明胶对照品峰面积。

[0022] 优选地,子步骤1)采用1-3根Aglient GPC排阻色谱柱串联使用,色谱柱规格为8μm,300mm×7.5mm。

[0023] 进一步地,色谱柱前串联可以使用Aglient保护柱(也可以不用)。优选Aglient保护柱规格为8μm,50mm×7.5mm。

[0024] 优选地,步骤(1)中称取不同峰顶分子量(M_p)的聚乙二醇和聚环氧乙烷标准样品7个;其中,聚乙二醇标准样品的峰顶分子量分别为1470、8500、20180,聚环氧乙烷标准样品的峰顶分子量分别为73650、219400、756500、1250000。

[0025] 进一步地,子步骤2)所建标准曲线的相关方程为: $y = -0.3272x + 13.037$,相关系数R为0.999。

[0026] 本发明中,所述硫化胶体冻干品的成分包含明胶、硫代硫酸钠和乙二胺四乙酸二钠。

[0027] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0028] 本发明提供一种采用凝胶渗透色谱法检测硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法。本方法能够快捷、准确地使用一种分析方法同时检测明胶的分子量分布和含量,有效监测硫化胶体冻干品的质量。本方法有较好的专属性,在特定的色谱条件下,明

胶分子无剪切,能将硫化胶体冻干品中的明胶和硫代硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠分离,能准确检测明胶的分子量分布及其含量;针对硫化胶体冻干品中明胶分子量分布或者其含量的检测技术,目前尚未见相关报道,本发明有效填补了该领域技术空白;同时本发明中流动相使用新型的ProClin 300抑菌剂,避免了使用传统防腐剂叠氮化钠(剧毒、易制爆)。

附图说明

- [0029] 图1为本发明较佳实施例中分子量标准样品标准曲线。
[0030] 图2为本发明较佳实施例中明胶对照品典型色谱图。
[0031] 图3为本发明较佳实施例中供试品典型色谱图。
[0032] 图4为本发明较佳实施例中分子量标准样品标准曲线(流速0.8mL/min)。
[0033] 图5为本发明较佳实施例中明胶对照品典型色谱图。
[0034] 图6为本发明较佳实施例中供试品典型色谱图。
[0035] 图7为本发明对比例中明胶对照品典型色谱图。

具体实施方式

[0036] 本发明提供一种采用凝胶渗透色谱法检测硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法。

[0037] 测试原理如下:凝胶渗透色谱(GPC)法是一种柱色谱分离分析方法,色谱柱中装有多孔物质的填料,聚合物分子通过色谱柱中的填料时按其大小的不同被分离,较大的分子难以进入小孔径在色谱柱中洗脱时间较短,较早出峰,较小的分子较晚出峰。用已知相对分子质量的标准聚合物建立一条保留时间和相对分子质量对应关系的“校正曲线”,即可从GPC谱图中计算出测试样品(硫化胶体冻干品中明胶)的相对分子质量和相对分子质量的分布信息。分别进样明胶标准品和硫化胶体冻干品,根据明胶标准品的峰面积,以外标法即可测定硫化胶体冻干品中明胶含量。

[0038] 分析方法如下:

[0039] 色谱条件:采用高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器。采用Aglient GPC排阻色谱柱(PL aquagel-OH MIXED-H 8 μ m 300mm $\times$ 7.5mm),串联3根色谱柱以提高分离度。色谱柱前串联使用Aglient保护柱(PL aquagel-OH Guard 8 μ m 50mm $\times$ 7.5mm)。流动相为盐溶液(含有0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠,0.05%的ProClin 300抑菌剂)。流速为0.8-1.2ml/min,优选1mL/min,等度洗脱,柱温30 $^{\circ}$ C,检测器温度40 $^{\circ}$ C,进样量20 μ l。

[0040] 分子量标准样品溶液:称取不同峰顶分子量(Mp)的聚乙二醇/聚环氧乙烷标准样品至少5个,分子量约均匀分布在1000-1500000之间,分别加流动相制成每1mL中约含5mg的溶液,在分子量及其分布检测中,溶液浓度的大小不影响其分子量及其分布;

[0041] 明胶对照品溶液:称取明胶适量,加流动相溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为明胶对照品溶液;

[0042] 供试品溶液:取硫化胶体冻干品1瓶(其中含明胶18.1mg、硫代硫酸钠2.0mg、乙二胺四乙酸二钠2.3mg),加流动相溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为供试品溶液;

[0043] 取分子量标准样品溶液、明胶对照品溶液和供试品溶液分别注入液相色谱仪,记

录色谱图,收集采集后的数据,采用GPC软件处理数据,得到硫化胶体冻干品中明胶的相对分子质量和相对分子质量的分布信息。以外标法计算得到硫化胶体冻干品中明胶的含量。

[0044] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0045] 实施例1 采用凝胶渗透色谱法检测硫化胶体冻干品中明胶分子量分布及其含量的方法(正常测试条件)

[0046] 色谱条件:采用安捷伦1260高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器(RID)。采用3根Aglient GPC排阻色谱柱串联使用(PL aquagel-OH MIXED-H $8\mu\text{m}$ $300\text{mm}\times 7.5\text{mm}$),该款色谱柱填料为混合孔径,其排阻范围约为6000-10000000,色谱柱前串联使用Aglient保护柱(PL aquagel-OH Guard $8\mu\text{m}$ $50\text{mm}\times 7.5\text{mm}$)。流动相为硝酸钠的盐溶液(含有0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠,0.05%的ProClin 300 抑菌剂)。流速为1.0ml/min,等度洗脱,分析时间35分钟,柱温 30°C ,检测器温度 40°C ,进样量 $20\mu\text{l}$ 。

[0047] 分子量标准样品溶液:称取不同峰顶分子量(M_p)的聚乙二醇/聚环氧乙烷标准样品7个(表1),分子量均匀分布在1000-1500000之间,分别加流动相制成每1mL中约含5mg的溶液。

[0048] 表1 分子量系列标准样品

[0049]	分子量标准样品	峰顶分子量 (M_p)	数均分子量 (M_n)	重均分子量 (M_w)
	聚乙二醇	1470	1440	1490
	聚乙二醇	8500	8130	8460
	聚乙二醇	20180	18450	19420
	聚环氧乙烷	73650	67700	71550
	聚环氧乙烷	219400	195500	212300
	聚环氧乙烷	756500	763500	808500
	聚环氧乙烷	1250000	1150000	1312000

[0050] 明胶对照品溶液:称取明胶50mg,加流动相10ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为明胶对照品溶液;平行配制两份。

[0051] 供试品溶液:取硫化胶体冻干品1瓶(其中含明胶18.1mg、硫代硫酸钠2.0mg、乙二醇四乙酸二钠2.3mg),加流动相3.62ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为供试品溶液。

[0052] 取分子量标准样品溶液各进样1针;明胶对照品溶液两份,每份各进样两针;供试品溶液各进样两针,记录色谱图,收集采集后的数据,采用GPC软件处理数据,得到硫化胶体冻干品中明胶的相对分子质量和相对分子质量的分布信息。以外标法计算得到硫化胶体冻干品中明胶的含量。

[0053] 结果:

[0054] 标准曲线的建立:以分子量标准样品出峰时间(峰顶时间)为横坐标,峰顶分子量的对数值($\lg M_p$)为纵坐标建立标准曲线(图1),标准曲线的相关方程为 $y = -0.3272x + 13.037$,标准曲线的相关系数R为0.999。

[0055] 明胶对照品进样后可得到明胶对照品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间),将其带入到分子量标准样品标准曲线中即可得到明胶的峰顶分子量 M_p ,进一步使用千谱HW-2000色谱工作站软件处理采集后的色谱图数据还可以得到明胶的分子量及其分布的详细信息,

包括峰顶分子量 (Mp)、数均分子量 (Mn)、重均分子量 (Mw)、分子量分布系数 (Mw/Mn)、切片细节等。得到明胶的峰面积后续可用于计算供试品中明胶的含量。明胶对照品典型色谱图见图2。

[0056] 供试品进样后可得到供试品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间),将其带入到分子量标准样品标准曲线中即可得到明胶的峰顶分子量Mp,进一步使用千谱HW-2000色谱工作站软件处理采集后的色谱图数据还可以得到明胶的分子量及其分布的详细信息,包括峰顶分子量 (Mp)、数均分子量 (Mn)、重均分子量 (Mw)、分子量分布系数 (Mw/ Mn)、切片细节等。得到明胶的峰面积信息,根据明胶对照品峰面积信息,计算供试品中明胶的含量。

[0057] 计算公式: $\text{含量 (Cx)} = \frac{\text{Cr} \times \text{Ax}}{\text{Ar}}$

[0058] 其中:Cx为供试品浓度;Cr为明胶对照品浓度;Ax为供试品峰面积;Ar为明胶对照品峰面积。

[0059] 供试品典型色谱图见图3。实验结果表明,供试品中的明胶峰保留时间为25.44min,与依地酸二钠及硫代硫酸钠峰的分度度>1,两峰已基本分离,可满足分析要求,方法有较好的专属性。

[0060] 测试结果见表2,将明胶对照品保留时间均值及供试品保留时间均值带入分子量标准样品标准曲线中计算可得到明胶对照品及供试品相对于聚乙二醇/聚环氧乙烷的分子量分别为51258和51645。使用千谱HW-2000色谱工作站软件处理采集后的色谱图数据还可以得到明胶的分子量及其分布的详细信息,代表样品信息见表3。以外标法计算供试品中明胶的含量为5.09mg/ml。

[0061] 表2 明胶对照品及供试品测试结果

[0062]	样品	保留时间 (min)	峰面积 (nRIU*min)	保留时间均值 (min)	峰面积均值 (nRIU*min)
	明胶对照品 1-1	25.45	15283.743	25.45	15431.67
	明胶对照品 1-2	25.45	15311.768		
	明胶对照品 2-1	25.45	15478.023		
	明胶对照品 2-2	25.45	15653.126		
	供试品-1	25.44	15650.866	25.44	15721.72
	供试品-2	25.44	15792.568		

[0063] 表3明胶对照品及供试品典型样品分子量及其分布详细信息

[0064]	样品	峰顶分子量 (Mp)	数均分子量 (Mn)	重均分子量 (Mw)	分子量分布系数 (Mw/Mn)
	明胶对照品	53992	43333	138913	3.21
	供试品	51396	21257	54221	2.55

[0065] 实施例2 方法系统适用性考察

[0066] 采用与实施例1中相同的分析条件。配制明胶对照品溶液和供试品溶液各一份。明胶对照品溶液:称取明胶50mg,加流动相10ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为明胶对照品溶液。供试品溶液:取硫化胶体冻干品1瓶(其中含明胶18.1mg、硫代硫酸钠2.0mg、乙二胺四乙酸二钠2.3mg),加流动相3.62ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为供试品溶液。每份样品平行进样6次,记录明胶峰留时间和峰面积,统计分析其峰保留时间和峰面积

的RSD,其RSD均应 $\leq 5\%$ 。

[0067] 实验结果见表4和表5,结果表明,明胶对照品及供试品峰面积及峰保留时间的RSD均 $< 1\%$,说明方法有较好系统适用性及重复性精密度。

[0068] 表4 明胶对照品系统适用性测试结果

[0069]	明胶对照品	保留时间 (min)	峰面积 (nRIU*min)
	明胶-1	25.43	16253.180
	明胶-2	25.43	16139.903
	明胶-3	25.43	16160.952
	明胶-4	25.43	16138.945
	明胶-5	25.43	16074.957
	明胶-6	25.43	16416.748
	平均值	25.43	16197.448
	标准偏差	0	111.257
	RSD	0.00%	0.69%

[0070] 表5 供试品系统适用性测试结果

[0071]	供试品	保留时间 (min)	峰面积 (nRIU*min)
	供试品-1	25.43	16253.180
	供试品-2	25.43	16139.903
	供试品-3	25.43	16160.952
	供试品-4	25.43	16138.945
	供试品-5	25.43	16074.957
	供试品-6	25.43	16416.748
	平均值	25.43	16197.448
	标准偏差	0	111.257
	RSD	0.00%	0.69%

[0072] 实施例3 方法准确度考察

[0073] 本实施例主要考察本方法在明胶含量计算中的准确度。

[0074] 溶液配制:明胶对照品溶液:称取明胶50mg,加流动相10ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为明胶对照品溶液。供试品加标溶液:取硫化胶体冻干品1瓶(其中含明胶18.1mg、硫代硫酸钠2.0mg、乙二胺四乙酸二钠2.3mg),加入明胶对照品溶液3.62mL溶解,作为加标供试品溶液。

[0075] 采用供试品加标考察方法的准确度。对照品平行测试2次,加标供试品平行测试6次,计算供试品加标回收率。6份加标供试品溶液中的明胶的回收率应为90.0%~110.0%,RSD $\leq 5.0\%$ 。

[0076] 回收率计算公式为:
$$\text{回收率 (P)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100\%$$

[0077] 其中:P为供试品加标回收率; C_1 为供试品加标样品浓度; C_2 为供试品浓度; C_3 为加标浓度。

[0078] 表6 明胶含量测定方法准确度验证

序号	供试品 浓度	加标浓度	供试品加标样 品浓度	回收率	回收率平均值	回收率 RSD
1	5mg/ml	5mg/ml	9.8mg/ml	96%	95.3%	2.6%
2			9.9mg/ml	98%		
3			9.6mg/ml	92%		
4			9.9mg/ml	98%		
5			9.8mg/ml	96%		
6			9.6mg/ml	92%		

[0080] 实验结果见表6,结果表明,6份加标供试品溶液中明胶的回收率平均值为95.3%, $RSD \leq 5.0\%$,满足要求,方法有较好的准确度。

[0081] 实施例4 方法耐用性考察(流速0.8ml/min)

[0082] 色谱条件:采用安捷伦1260高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器(RID)。采用3根Aglient GPC排阻色谱柱串联使用(PL aquagel-OH MIXED-H $8\mu m$ 300mm $\times$ 7.5mm),色谱柱前串联使用Aglient保护柱(PL aquagel-OH Guard $8\mu m$ 50mm $\times$ 7.5mm)。流动相为硝酸钠的盐溶液(含有0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠,0.05%的ProClin 300 抑菌剂)。流速为0.8ml/min,等度洗脱,分析时间45分钟,柱温30℃,检测器温度40℃,进样量20 μ l。

[0083] 分子量标准样品溶液:称取不同峰顶分子量(M_p)的聚乙二醇/聚环氧乙烷标准样品7个(表1),分子量均匀分布在1000-1500000之间,分别加流动相制成每1mL中约含5mg的溶液。

[0084] 明胶对照品溶液:称取明胶50mg,加流动相10ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为明胶对照品溶液。

[0085] 供试品溶液:取硫化胶体冻干品1瓶(其中含明胶18.1mg、硫代硫酸钠2.0mg、乙二胺四乙酸二钠2.3mg),加流动相3.62ml溶解,使得其中明胶浓度为5mg/mL,作为供试品溶液。

[0086] 取分子量标准样品溶液各进样1针;明胶对照品溶液进样两针;供试品溶液进样两针,记录色谱图,收集采集后的数据,采用GPC软件处理数据,得到硫化胶体冻干品中明胶的相对分子质量和相对分子质量的分布信息。以外标法计算得到硫化胶体冻干品中明胶的含量。

[0087] 结果:标准曲线的建立:以分子量标准样品出峰时间(峰顶时间)为横坐标,峰顶分子量的对数值($\lg M_p$)为纵坐标建立标准曲线(图4),标准曲线的相关方程为 $y = -0.2594x + 12.953$,标准曲线的相关系数R为0.999。

[0088] 明胶对照品进样后可得到明胶对照品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间),将其带入到分子量标准样品标准曲线中即可得到明胶的峰顶分子量 M_p 。得到明胶的峰面积后续可

用于计算供试品中明胶的含量。明胶对照品典型色谱图见图5。

[0089] 供试品进样后可得到供试品溶液中明胶的出峰时间(峰顶时间),将其带入到分子量标准样品标准曲线中即可得到明胶的峰顶分子量 M_p 。得到明胶的峰面积信息,根据明胶对照品峰面积信息,计算供试品中明胶的含量。

[0090] 计算公式: $\text{含量}(C_x) = \frac{C_r \times A_x}{A_r}$

[0091] 其中: C_x 为供试品浓度; C_r 为明胶对照品浓度; A_x 为供试品峰面积; A_r 为明胶对照品峰面积。

[0092] 供试品典型色谱图见图6。实验结果表明,供试品中的明胶峰保留时间为31.04min,与依地酸二钠及硫代硫酸钠峰的分度度 >1 ,两峰已基本分离,可满足分析要求,方法有较好的专属性。

[0093] 测试结果见表7,将明胶对照品保留时间均值及供试品保留时间均值带入分子量标准样品标准曲线中计算可得到明胶对照品及供试品相对于聚乙二醇/聚环氧乙烷的分子量分别为81583和79433。以外标法计算供试品中明胶的含量为5.17mg/mL。代表样品结果见表8。

[0094] 表7 明胶对照品及供试品测试结果

[0095]	样品	保留时间 (min)	峰面积 (nRIU*min)	保留时间均值 (min)	峰面积均值 (nRIU*min)
	明胶对照品-1	30.99	19073.750	31.00	19348.53
	明胶对照品-2	31.00	19623.311		
	供试品-1	31.02	21174.020	31.03	20008.40
	供试品-2	31.04	18842.771		

[0096] 表8 明胶对照品及供试品典型样品分子量及其分布详细信息

[0097]	样品	峰顶分子量 (M_p)	数均分子量 (M_n)	重均分子量 (M_w)	分子量分布系数 (M_w/M_n)
	明胶对照品	50612	20255	93648	4.62
	供试品	81875	33649	76178	2.26

[0098] 对比例:

[0099] 色谱条件:采用安捷伦1260高效液相色谱仪,检测器为示差折光检测器(RID)。采用3根单一填料孔径,但排阻范围不同的Aglient GPC排阻色谱柱串联使用(PL aquagel-OH 30,8 μ m 300mm $\times$ 7.5mm;PL aquagel-OH 40,8 μ m 300mm $\times$ 7.5mm;PL aquagel-OH 50,8 μ m 300mm $\times$ 7.5mm),色谱柱前串联使用Aglient保护柱(PL aquagel-OH Guard 8 μ m 50mm $\times$ 7.5mm)。流动相为硝酸钠的盐溶液(含有0.2mol/L硝酸钠,0.01mol/L磷酸二氢钠,0.007mol/L氢氧化钠,0.05%的ProClin 300 抑菌剂)。流速为1.0ml/min,等度洗脱,分析时间35分钟,柱温30 $^{\circ}$ C,检测器温度40 $^{\circ}$ C,进样量20 μ l。

[0100] 采用与实施例1中相同的明胶对照品进样分析,测试结果见图7。结果表明,单一填料孔径,但排阻范围不同的色谱柱不能得到理想的结果。这可能是因为使用单一填料孔径的色谱柱,样品在分析过程中发生了剪切,导致峰分布过宽,明胶对照品供试品峰形很差,难以获得它们的分子量及其分布、含量等信息。

[0101] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在

本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

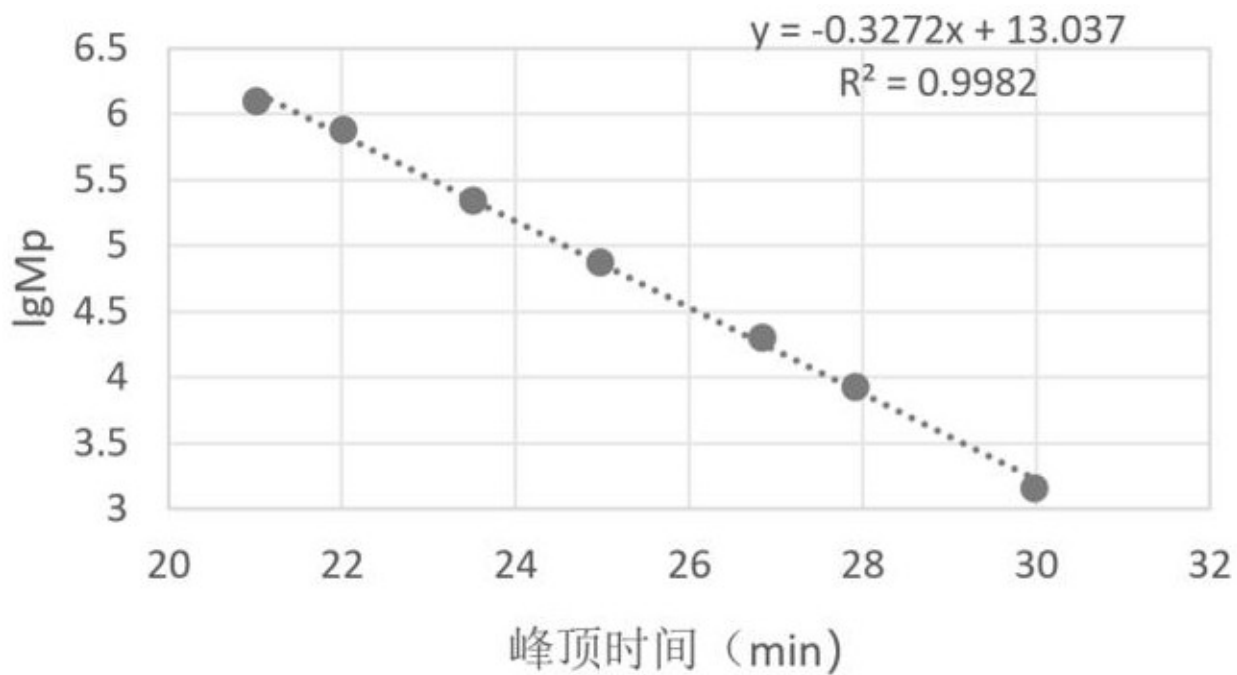


图 1

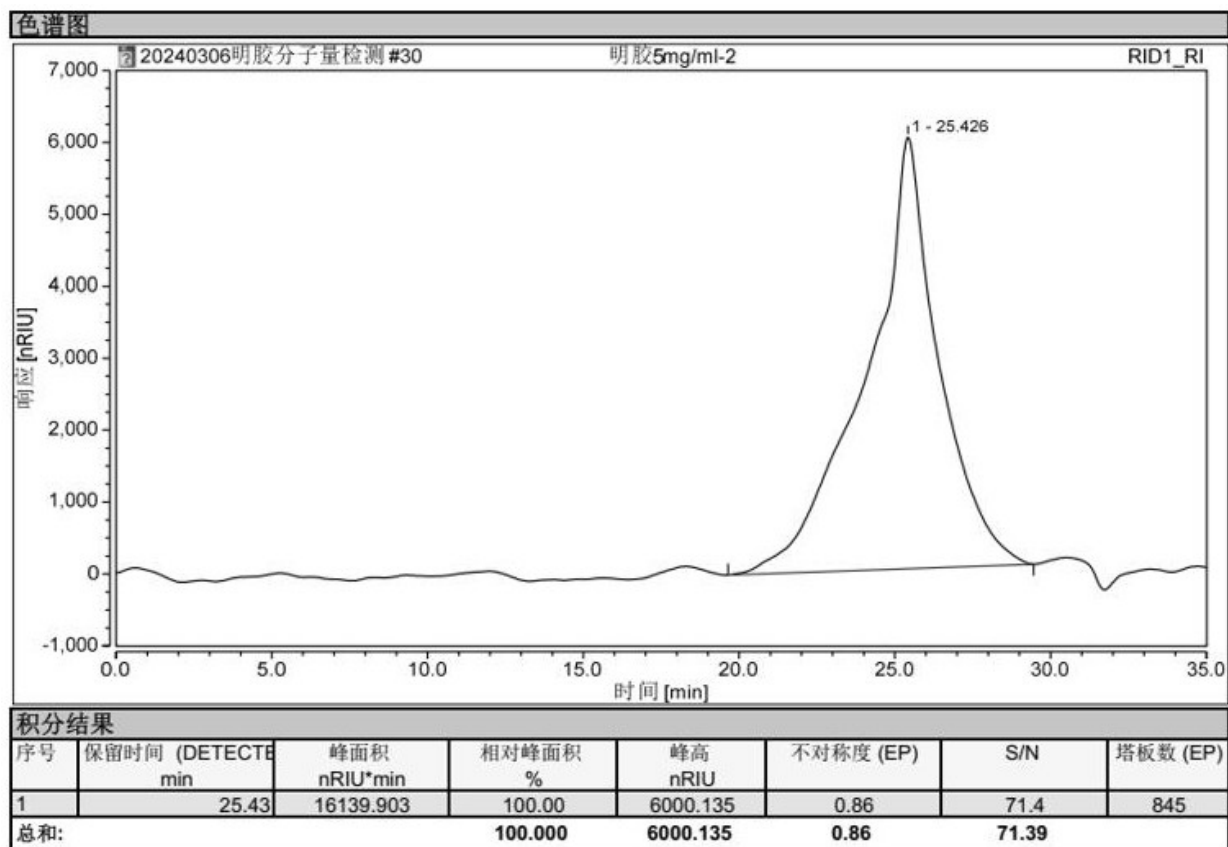


图 2

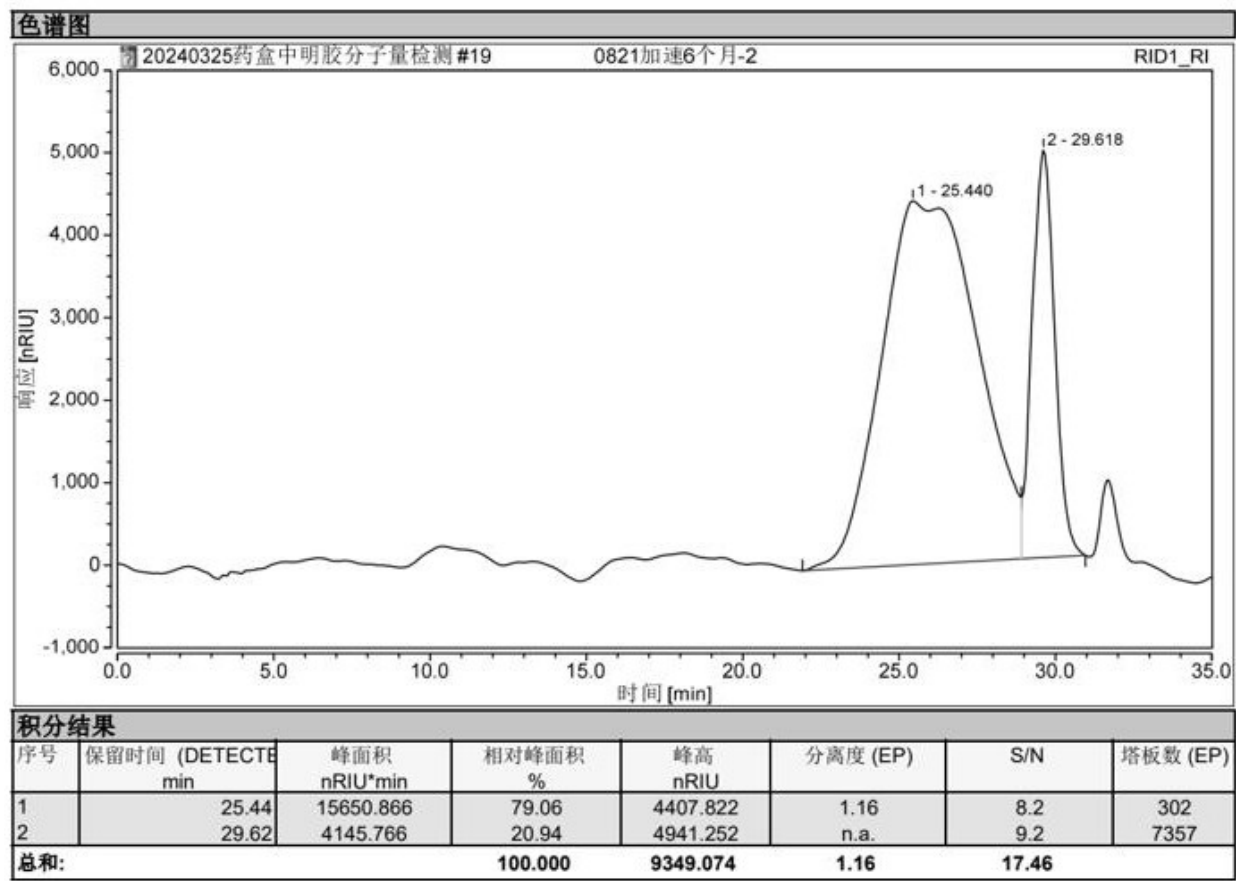


图 3

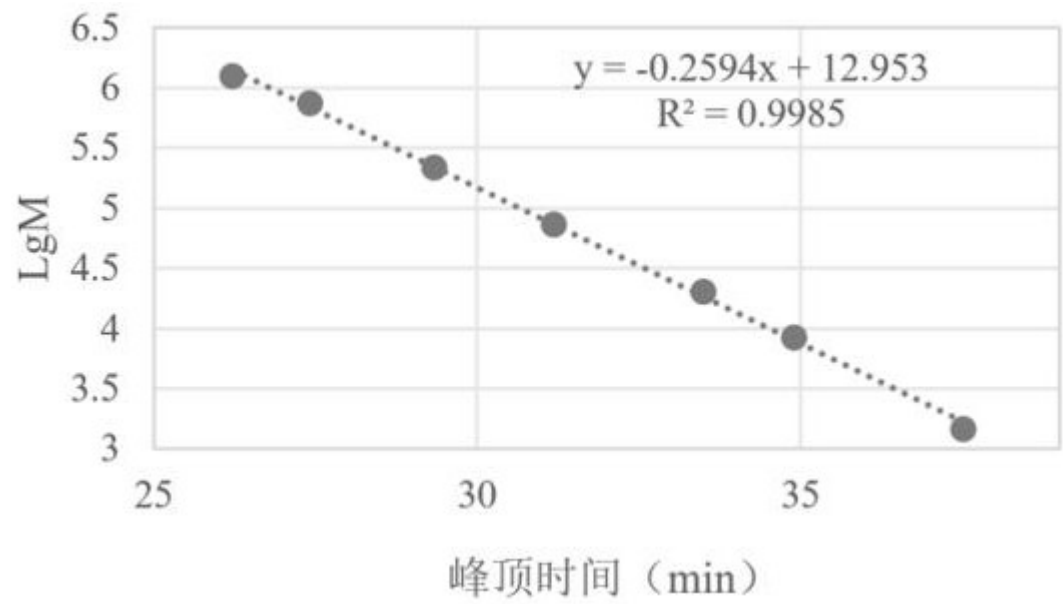


图 4

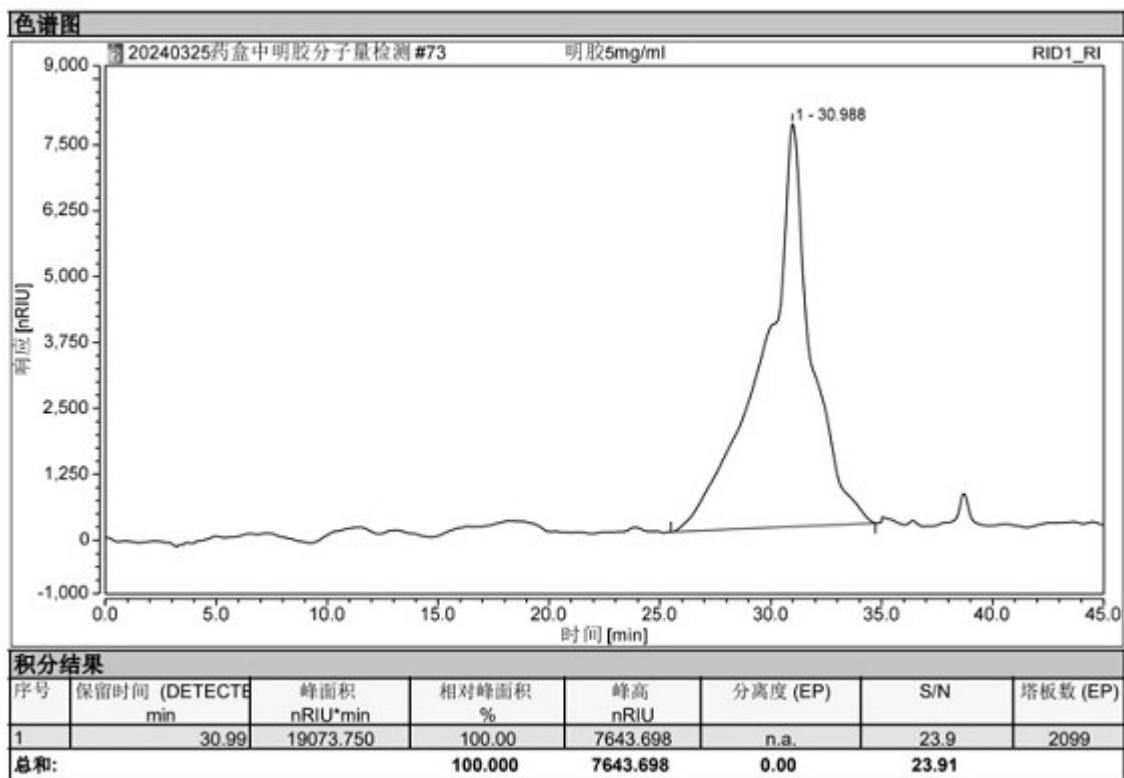


图 5

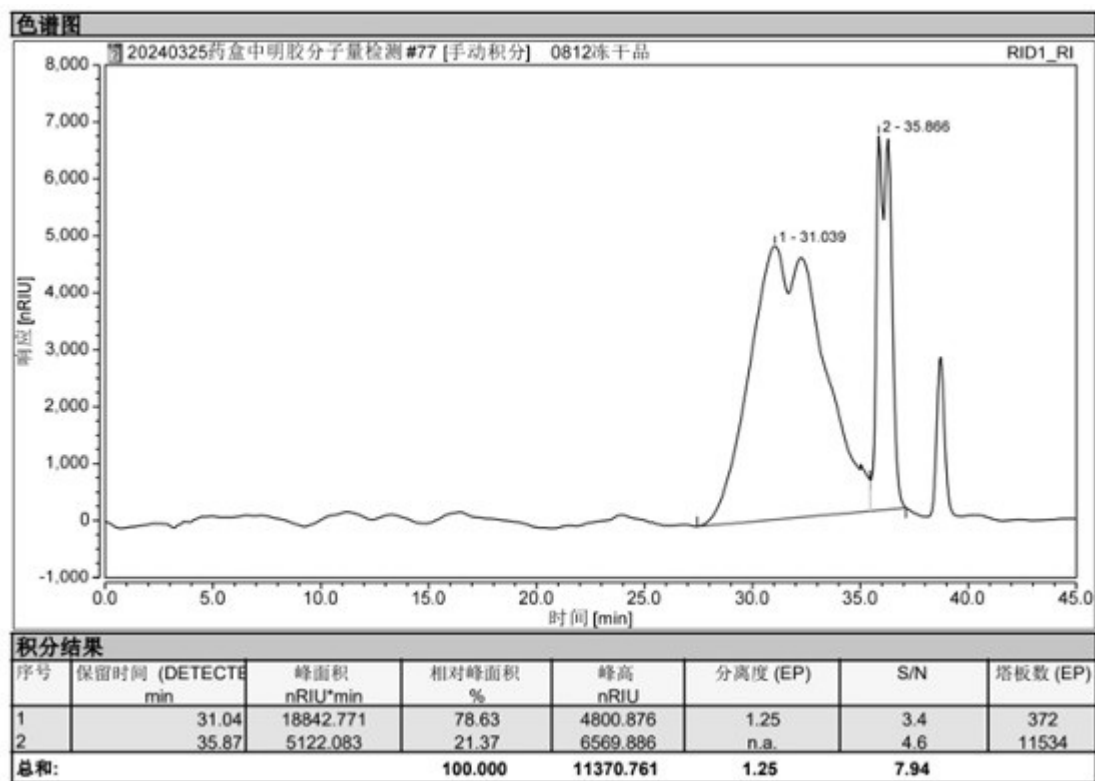


图 6

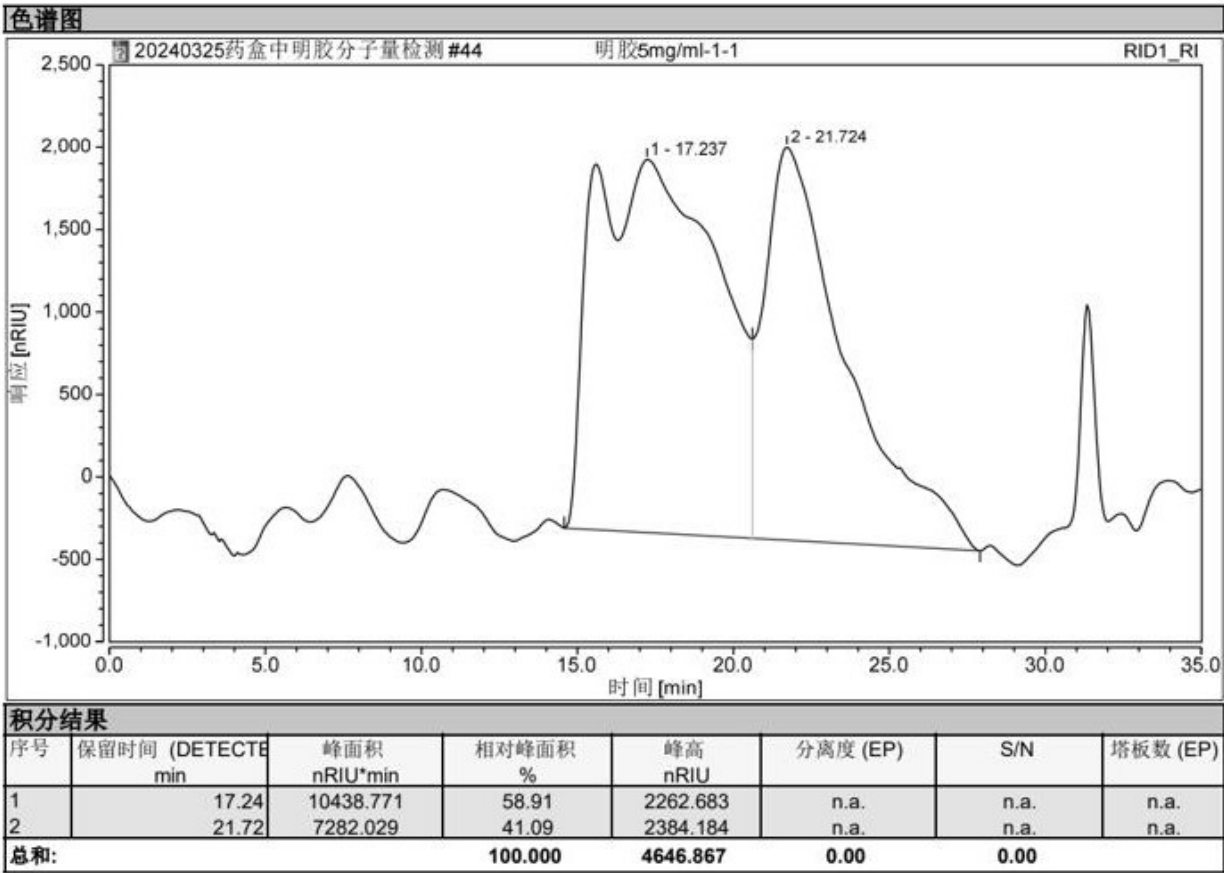


图 7