

HPLC-ELSD 测定复方甘草酸铵注射液中 2 种未衍生氨基酸的含量

张建业, 冯向东*

(河南省南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 用 HPLC-ELSD 法直接测定复方甘草酸铵注射液中 2 种未衍生氨基酸的含量。方法: 使用 Agilent-ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相 A(乙腈)-B(5.0 mmol·L⁻¹ 七氟丁酸的 0.7% 三氟醋酸溶液), 梯度洗脱(0~5 min, 0% A; 5~10 min, 15% A; 10~25 min, 35% A), ELSD 漂移管温度 80 °C, 氮气流量 2.0 L·min⁻¹, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样 10 μL。结果: 甘氨酸进样量在 4.858~29.145 μg, 盐酸半胱氨酸进样量在 0.386~2.316 μg 时, 其对数值与峰面积对数值线性关系良好, 回收率分别为 97.43%, 96.99%。结论: 测定方法简便, 结果准确, 可用于复方甘草酸铵注射液中 2 种氨基酸的测定。

[关键词] 复方甘草酸铵注射液; 未衍生化; 甘氨酸; 盐酸半胱氨酸; 高效液相色谱; 蒸发光散射检测器

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0161-03

[doi] 10.11653/syjf2013140161

Direct Determination of 2 Underivatized Amino Acids in Compound Gancaosuanan Injection by HPLC-ELSD

ZHANG Jian-ye, FENG Xiang-dong*

(Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang 473000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine 2 underivatized amino acids in Compound Gancaosuanan Injection with HPLC-ELSD. **Method:** The analysis was carried out on a Agilent-ODS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile (A) -5.0 mmol·L⁻¹ heptafluorobutyric acid in 0.7% trifluoroacetic acid solution (B) in gradient elution mode (0-5 min, 0% A; 5-10 min, 15% A; 10-25 min, 35% A). Drift tube temperature was 80 °C, gas flow rate was 2.0 L·min⁻¹. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. Column temperature was kept at 35 °C and the inject volume was 10 μL. **Result:** The glycine and cysteine hydrochloride were linear in the range of 4.858-29.145 μg and 0.386-2.316 μg. The average recovery was 97.43%, 96.99% respectively. **Conclusion:** The method is convenient and accurate, which can be used to determine 2 amino acids in Compound Gancaosuanan Injection.

[Key words] Compound Gancaosuanan Injection; underivatized; glycine; cysteine hydrochloride; HPLC; ELSD

复方甘草酸铵注射液是以甘草酸铵为主药并以甘氨酸、盐酸半胱氨酸两种氨基酸配伍而成的复方制剂, 用于急、慢性, 迁延型肝炎引起的肝功能异常,

亦可用于食物中毒, 药物中毒、药物过敏等的治疗。制剂中盐酸半胱氨酸在体内可转化为蛋氨酸, 蛋氨酸有较好的保护肝细胞和改善肝功能的作用。现行标准^[1]中采用容量法分别测定盐酸半胱氨酸与甘氨酸含量, 但在实际检验中, 该方法操作繁琐, 干扰因素多, 误差较大。现在氨基酸的含量一般都采用柱前衍生化 RP-HPLC 法测定^[2-3], 由于柱前衍生化反应溶液量较少, 试剂容易挥发, 衍生化时间较长,

[收稿日期] 20121022(005)

[第一作者] 张建业, 主管药师, 从事药品质量研究, Tel: 0377-63183771, E-mail: 958723470@qq.com.cn

[通讯作者] * 冯向东, 副主任药师, 从事药品质量研究, Tel: 0377-63893589, E-mail: fxdem123@yahoo.com.cn

致使试验条件不易控制;同时衍生物是否具有足够的稳定性也需要考察,这些因素的限制使该法不利于直接、快速测定氨基酸。本文参考文献[4-5],用 HPLC-ELSD 法对复方甘草酸铵注射液中未衍生的甘氨酸、盐酸半胱氨酸进行直接测定,结果较满意。

1 仪器与试剂

Waters 2695 型高效液相色谱仪, Waters 2424 蒸发光散射检测器(Empower Two 色谱管理软件,美国 Waters 公司), BP-211D 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司), YB-Z 型真空恒温干燥箱(天津药典标准仪器厂), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

甘氨酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 140689-200401)、盐酸半胱氨酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 140461-200501);三氟乙酸(上海国药集团化学试剂有限公司)七氟丁酸(南京中东风玻仪器有限公司),色谱纯乙腈(天津市科密欧化学试剂开发中心),重蒸馏水(自制),其余试剂为分析纯。复方甘草酸铵注射液、缺甘氨酸、盐酸半胱氨酸的样品均由南阳利欣药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A(乙腈)-B(5.0 mmol·L⁻¹七氟丁酸的 0.7% 三氟醋酸溶液),流动相 A 与流动相 B 梯度洗脱(0~5 min, 0:100; 5~10 min, 15:85; 10~25 min, 35:65);ELSD 漂移管温度 80 °C(氮气流量 2.0 L·min⁻¹,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 10 μL,理论塔板数按甘氨酸峰计不低于 3 000)。

2.2 样品溶液制备

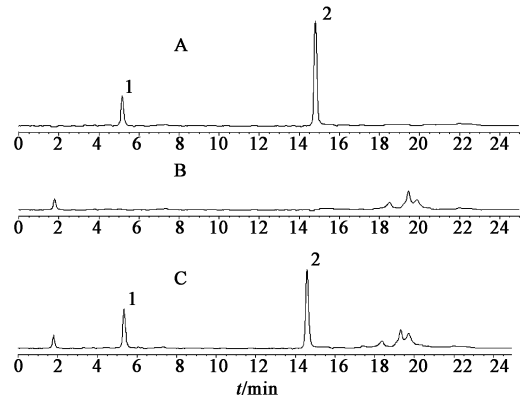
2.2.1 对照品溶液制备 分别精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的甘氨酸对照品 97.15 mg、盐酸半胱氨酸对照品 7.72 mg,置 10 mL 量瓶中,加 0.01 mol·L⁻¹盐酸溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加 0.01 mol·L⁻¹盐酸溶解并稀释至刻度,摇匀,即得含甘氨酸 0.971 5 g·L⁻¹、盐酸半胱氨酸 0.077 2 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品 1 mL,移置 20 mL 量瓶中,加 0.01 mol·L⁻¹盐酸稀释至刻度,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.2.3 阴性样品溶液制备 取缺甘氨酸、盐酸半胱氨酸的样品,按供试品溶液制备方法制得阴性样品溶液。

2.3 空白试验 为进一步确定方法的可行性,取阴性样品溶液,依法测定,结果阴性样品溶液色谱在与

混合对照品峰相应的保留时间处无色谱峰,表明无干扰,色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 阳性; C. 供试品
1. 甘氨酸; 2. 盐酸半胱氨酸

图 1 复方甘草酸铵注射液 HPLC 色谱

2.4 线性关系考察 分别取上述对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL 进样,按上文的条件与方法进样测定,以对照品的 6 个进样量对数值 X 为横坐标,以峰面积对数值 Y 为纵坐标,进行线性回归,甘氨酸回归方程为 $Y = 1.351X + 4.272$ ($r = 0.9975$),线性范围 4.858 ~ 29.145 μg;盐酸半胱氨酸回归方程为 $Y = 1.723X + 8.911$ ($r = 0.9952$),线性范围 0.386 ~ 2.316 μg。

2.5 精密度试验 取对照品溶液,按 2.1 项下重复进样 5 次,测定峰面积,甘氨酸 RSD 1.97%,盐酸半胱氨酸 RSD 1.04%。

2.6 稳定性试验 取同一批供试品溶液,室温下放置,按 2.1 项下测定方法和条件,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 测峰面积,甘氨酸峰面积 12 h 内 RSD 2.53%,盐酸半胱氨酸峰面积 12 h 内 RSD 2.21%,说明甘氨酸与盐酸半胱氨酸在 0.01 mol·L⁻¹盐酸中稳定。

2.7 重复性试验 取同一批样品 5 份,按 2.2.2 项下制成供试品溶液,按 2.1 项下分别测定峰面积,利用标准曲线计算,甘氨酸与盐酸半胱氨酸 RSD 分别为 1.95%, 2.07%。

2.8 回收率试验 取已知含量的样品(批号 11041802,甘氨酸 19.81 g·L⁻¹、盐酸半胱氨酸 1.466 g·L⁻¹)6 份,每份 0.5 mL,分别移置 20 mL 量瓶中,每份各精密加入对照品溶液 1 mL(浓度为甘氨酸 9.826 g·L⁻¹,盐酸半胱氨酸 0.747 g·L⁻¹),按 2.2.2 项下制成供试品溶液,按 2.1 项下分别测定。计算回收率,结果甘氨酸与盐酸半胱氨酸平均回收率分别为 97.43%, 96.99%; RSD 分别为 1.61%, 1.89%。见表 1~2。

表1 甘氨酸加样回收率试验

取样量 /mL	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.5	9.905	9.826	19.64	99.07		
0.5	9.905	9.826	19.63	98.97		
0.5	9.905	9.826	19.49	97.55		
0.5	9.905	9.826	19.31	95.72	97.43	1.61
0.5	9.905	9.826	19.52	97.85		
0.5	9.905	9.826	19.28	95.41		

表2 盐酸半胱氨酸加样回收率试验

取样量 /mL	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.5	0.733	0.747	1.475	99.33		
0.5	0.733	0.747	1.456	96.79		
0.5	0.733	0.747	1.471	98.80		
0.5	0.733	0.747	1.458	97.05	96.99	1.89
0.5	0.733	0.747	1.443	95.05		
0.5	0.733	0.747	1.442	94.92		

2.9 样品含量测定 取复方甘草酸铵注射液3批(11041802, 11041803, 11041804),按2.2.2项下制成供试品溶液,按2.1项下分别测定。计算含量,结果3个批号的样品含甘氨酸分别为19.81, 19.49, 19.58 g·L⁻¹,含盐酸半胱氨酸分别为1.466, 1.471, 1.449 g·L⁻¹。

3 讨论

复方甘草酸铵注射液质量标准^[1]规定用氯化溴滴定法测定盐酸半胱氨酸含量,试验要求加入1 mol·L⁻¹的盐酸2 mL,静置后生成白色沉淀,此凝乳状沉淀使溶液黏稠,导致下一步过滤困难。亚硫酸钠若去除不彻底,也会干扰检验结果,实践中发现用该法含量测定结果偏高。

大部分氨基酸分子中无共轭结构,无紫外吸收或较弱,所以不能直接用紫外检测器检测,只能通过适当衍生化后产生有紫外吸收的衍生物,方可用紫外检测器或荧光检测器检测^[6-10]。现在常用的氨基酸柱前衍生法根据衍生化试剂不同有PITC法、AQC法、OPA-FMOC法和DNFB等法。这些方法本身要求反应选择性强、定量进行,衍生物有足够的稳定性,但笔者通过试验发现的OPA-半胱氨酸和DNFB-半胱氨酸衍生物均不稳定,使用这两种方法测半胱氨酸含量时误差较大。采用蒸发光散射检测器检测则可省去衍生化这一步骤,试验时间大大缩短。

ELSD检测器作为一种准通用型检测器,仅对不挥发被分析物产生信号,其信号响应值仅取决于

被分析物质颗粒的大小和数量,而不需考虑有无紫外吸收的问题,该检测方法对流动相的变化不敏感,即使在梯度洗脱时基线也很平稳。通过调节ELSD检测器的漂移管温度与载气流速,可以使基线噪音最小,响应值相对最高,从而获得很好的色谱图。本研究中考了漂移管温度70, 80, 90℃,气体流速1.8, 2.0, 2.2 L·min⁻¹条件下的色谱情况,结果选定漂移管温度80℃,气体流速2.0 L·min⁻¹为试验条件,该条件下基线平稳,噪音小,被测成分均有适宜的响应值。

氨基酸在水溶液中为强电解质,在极性溶剂中溶解度较大,在极性较弱的C₁₈柱上保留时间非常短。七氟丁酸可与氨基酸分子形成离子对,抑制了氨基酸的解离,适当延长了保留时间,改善了峰型。本研究采用乙腈-5.0 mmol·L⁻¹七氟丁酸-0.7%三氟乙酸系统,甘氨酸和半胱氨酸分离完全,色谱峰型对称性好、峰形尖锐,保留时间适当。试验全过程操作简便,结果准确、可靠,可用于该制剂的质量控制。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 药品标准. 二部. 第5册[S]. 1996:55.
- [2] 欧金秀,谷陟欣,张妮瑜,等. 柱前衍生HPLC同时测定驴胶补血颗粒中6种水解氨基酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16):93.
- [3] 罗兰,张素中,黄月纯,等. 玉屏风煎剂中氨基酸类成分的HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):64.
- [4] 鄢丹,张毅,韩玉梅,等. HPLC-ELSD法测定舒血通注射液中17种未衍生氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4):558.
- [5] 白玉静,高晓燕,张宏桂,等. HPLC-ELSD法测定清开灵注射液中19种氨基酸含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24):3301.
- [6] 陈鼎雄,林立. HPLC-ELSD法测定复方氨基酸注射液(3AA)中三组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10):163.
- [7] 孙莲,张焯,孟磊,等. 柱前衍生RP-HPLC法测定桑叶中16种游离氨基酸的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(36):35.
- [8] 柯雪红,花汝凤,陈锦富. 补中益气丸中氨基酸类成分指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):81.
- [9] 朱晓伟,高新星,安芳,等. 柱前衍生化HPLC-荧光检测法测定高血压患者尿液中22种游离氨基酸的浓度[J]. 中国药房, 2010, 21(30):2823.
- [10] 何为荣,刘萍. 高效液相-荧光检测法测定乌灵胶囊中14种氨基酸的含量[J]. 中成药, 2010, 32(8):87.

[责任编辑 顾雪竹]