

改进HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸原料药中的有关物质^Δ

陈宇堃*, 陈 华#, 梁蔚阳(广东省药品检验所, 广州 510180)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2509-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.15

摘要 目的:改进测定门冬氨酸鸟氨酸原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Luna NH₂(两根串联),流动相为0.02 mol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.6)-乙腈(40:60, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为205 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μL。结果:马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、β-门冬氨酸门冬氨酸检测质量浓度线性范围分别为5.398~26.992 μg/mL($r=0.999\ 1$)、5.204~26.021 μg/mL($r=0.999\ 3$)、5.149~25.749 μg/mL($r=0.999\ 6$)、5.174~25.874 μg/mL($r=0.999\ 3$)、5.164~25.823 μg/mL($r=0.999\ 3$)、5.194~25.973 μg/mL($r=0.999\ 5$);定量限分别为0.22、0.53、51.50、103.50、0.26、8.31 ng,检出限分别为0.13、0.26、10.30、20.70、0.13、2.08 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均不超过2%;加样回收率分别为99.30%~102.31%(RSD=1.02%, $n=9$)、99.88%~100.89%(RSD=0.37%, $n=9$)、99.36%~101.53%(RSD=0.70%, $n=9$)、99.13%~102.65%(RSD=1.15%, $n=9$)、100.18%~101.45%(RSD=0.38%, $n=9$)、99.39%~100.81%(RSD=0.58%, $n=9$)。6批样品均未检出马来酸、琥珀酸和β-门冬氨酸门冬氨酸;3-氨基-2-哌啶酮含量为0.006%~0.056%,苹果酸含量为0.014%~0.071%,富马酸含量为0.000 5%~0.003 4%,最大未知杂质含量为0.013%~0.110%,未知杂质总含量为0.013%~0.120%。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性均较好,可用于门冬氨酸鸟氨酸原料药中有关物质的测定。

关键词 门冬氨酸鸟氨酸;高效液相色谱法;马来酸;3-氨基-2-哌啶酮;琥珀酸;苹果酸;富马酸;β-门冬氨酸门冬氨酸;有关物质

Determination of Related Substances in Ornithine Aspartate Raw Material by Improved HPLC

CHEN Yukun, CHEN Hua, LIANG Weiyang (Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the determination method of related substances in ornithine aspartate raw material. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Phenomenex Luna NH₂ column (two series-connected) with mobile phase consisted of 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution (pH 5.6)-acetonitrile (40:60, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 205 nm, and column temperature was 35 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range of maleic acid, 3-amino-2-piperidinone, succinic acid, malic acid, fumaric acid and β-aspartyl-aspartic acid were 5.398-26.992 μg/mL ($r=0.999\ 1$), 5.204-26.021 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 5.149-25.749 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 5.174-25.874 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 5.164-25.823 μg/mL ($r=0.999\ 3$), 5.194-25.973 μg/mL ($r=0.999\ 5$). The limits of quantitation were 0.22, 0.53, 51.50, 103.50, 0.26 and 8.31 ng; the limits of detection were 0.13, 0.26, 10.30, 20.70, 0.13 and 2.08 ng. RSDs of precision, stability, and reproducibility tests were no more than 2%. The average recoveries were 99.30%-102.31% (RSD=1.02%, $n=9$), 99.88%-100.89% (RSD=0.37%, $n=9$), 99.36%-101.53% (RSD=0.70%, $n=9$), 99.13%-102.65% (RSD=1.15%, $n=9$), 100.18%-101.45% (RSD=0.38%, $n=9$), 99.39%-100.81% (RSD=0.58%, $n=9$). Neither maleic acid, succinic acid and β-aspartyl-aspartic acid were found in 6 batches of samples. The contents of 3-amino-2-piperidinone were 0.006%-0.056%; the contents of malic acid were 0.014%-0.071%; the contents of fumaric acid were 0.000 5%-0.003 4%; the contents of maximal unknown impurity were 0.013%-0.110%; total contents of unknown impurity were 0.013%-0.120%. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for the determination of the related substances in ornithine aspartate raw material.

KEYWORDS Ornithine aspartate; HPLC; Maleic acid; 3-amino-2-piperidinone; Succinic acid; Malic acid; Fumaric acid; β-aspartyl-aspartic acid; Related substance

门冬氨酸鸟氨酸由德国麦氏大药厂于20世纪60年代研发成功,其注射液于70年代应用于临床。该药于1991年收载入《德国药典》^[1],同时被美国FDA批准用于

Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.粤科规财字[2016]48号-2016A010121004、粤科规财字[2015]150号-2015A030402004);广东省医学科学技术研究基金项目(No.粤卫函[2016]568号-B2016121、B2016106)

* 副主任药师。研究方向:生化药品质量控制。电话:020-81887684。E-mail: bettycyk@163.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:生化药品质量标准。电话:020-81887684。E-mail: gdchenhua@sina.com

治疗肝性脑病^[2]。在2014年《美国肝病协会和欧洲肝病协会慢性肝炎致肝性脑病实践指南》中,门冬氨酸鸟氨酸被推荐用于肝性脑病的治疗^[3]。谷氨酰胺是氨的解毒产物,也是氨的储存与运输形式;氨的主要代谢途径是在肝脏中通过尿素循环合成尿素而排出体外。在正常生理和病理条件下,尿素及谷氨酰胺的合成会受到鸟氨酸和其他二羧基化合物的影响。门冬氨酸鸟氨酸进入血液后可分解为鸟氨酸和门冬氨酸。鸟氨酸可激活尿素合成过程中的鸟氨酸氨基甲酰转移酶和氨基甲酰磷酸合成酶,并通过肝脏中的鸟氨酸循环来加速尿素合

成,促进氨的代谢,迅速降低血氨水平,由此可促进肝细胞自身的修复和再生,从而有效地改善肝功能,以恢复机体的能量平衡^[4-5]。门冬氨酸可参与肝细胞内核酸的合成,促进损伤肝细胞的修复,并可间接参与肝细胞内三羧酸循环,提供能量代谢的中间产物,从而增强肝脏功能^[6]。国外研究发现,门冬氨酸能够激活N-甲基-D-门冬氨酸(NMDA)受体,使 β -arrestin-2信号分子活性增强,调节G蛋白偶联受体(GPCRs),抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)活性,从而减轻肝脏炎性反应,改善肝脏炎性病变^[6]。近年来研究表明,门冬氨酸鸟氨酸在治疗肝性脑病、脂肪性肝病、病毒性肝炎、肝硬化和药物性肝损伤等方面均有明显疗效^[7]。

2015年版《中国药典》(二部)采用高效液相色谱法(HPLC),以氨基键合硅胶为色谱柱填充剂、0.02 mol/L磷酸二氢钾缓冲液(pH 5.6)-乙腈(40:60, V/V)为流动相对门冬氨酸鸟氨酸原料药中5种已知杂质[马来酸、富马酸、精氨酸、3-氨基-2-哌啶酮和门冬氨酸缩合物(β -门冬氨酸门冬氨酸)]进行含量测定,并利用自身对照法测定未知杂质的含量^[8]。笔者在试验中发现,在该色谱条件下,溶剂峰与马来酸峰存在重叠情况;精氨酸峰响应值较低,灵敏度不高;自身对照溶液的门冬氨酸鸟氨酸质量浓度为4 μ g/mL,该浓度下鸟氨酸峰响应值较低。《美国药典》(40版)收录的门冬氨酸标准中除规定马来酸和富马酸的限度分别为0.05%和0.10%外,还规定了苹果酸的限度为0.20%^[9];另外,琥珀酸亦为门冬氨酸生产过程中的副产物。因此,有必要对2015年版《中国药典》(二部)中的色谱条件进行改进,并增加对苹果酸、琥珀酸的含量测定。而目前尚未见文献报道同时测定门冬氨酸鸟氨酸原料药中马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸含量的方法。因此,本研究参考2015年版《中国药典》(二部)门冬氨酸鸟氨酸原料药中有关物质测定的色谱条件^[8],以两根氨基色谱柱串联的方式,建立了同时测定门冬氨酸鸟氨酸原料药中上述6种已知杂质含量的方法,以为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

E2695型HPLC仪,包括紫外检测器、Empower 3数据处理软件等(美国Waters公司);MS205DU型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);PB-10型pH计(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

门冬氨酸鸟氨酸原料药(生产企业1,批号:17371、17372、17373,纯度:99.9%、100.2%、100.1%;生产企业2,批号:67911、67912、67913,纯度:100.0%、100.6%、100.1%);门冬氨酸鸟氨酸对照品(日本协和发酵生化株式会社,批号:163561,纯度:99.7%);3-氨基-2-哌啶酮对照品(东京化成工业株式会社,批号:P1195896,纯度:98.1%);马来酸对照品(批号:LKK1196,纯度:99.6%)、

琥珀酸对照品(批号:LKM6297,纯度:99.9%)、苹果酸对照品(批号:LKH3957,纯度:99.9%)、富马酸对照品(批号:LKL0807,纯度:99.8%)均由日本和光纯药工业株式会社提供; β -门冬氨酸门冬氨酸对照品(上海柯维化学技术有限公司,批号:DH110298,纯度:98.2%);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、浓氨溶液均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna NH₂(150 mm \times 4.6 mm, 3 μ m),两根串联;流动相:0.02 mol/L磷酸二氢钾缓冲液(取磷酸二氢钾2.72 g,加水500 mL溶解,加浓氨溶液5 mL,用水稀释至1 000 mL,用磷酸调节pH至5.6)-乙腈(40:60, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;检测波长:205 nm;进样量:20 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 稀释液 以0.02 mol/L磷酸二氢钾缓冲液(取磷酸二氢钾2.72 g,加水500 mL溶解,加浓氨溶液5 mL,用水稀释至1 000 mL,用磷酸调节pH至5.6)-乙腈(60:40, V/V)为稀释液。

2.2.2 系统适用性试验用混合对照品溶液 分别精密称取门冬氨酸鸟氨酸、马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸对照品各适量,加入“2.2.1”项下稀释液溶解,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg和马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸各10 μ g的系统适用性试验用混合对照品溶液。

2.2.3 混合对照品贮备液 分别精密称取马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸对照品各适量,加入“2.2.1”项下稀释液溶解,制成每1 mL中含马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸各0.5 mg的混合对照品贮备液。

2.2.4 混合对照品溶液 精密量取“2.2.3”项下混合对照品贮备液适量,加入“2.2.1”项下稀释液制成每1 mL中含马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸各10 μ g的混合对照品溶液。

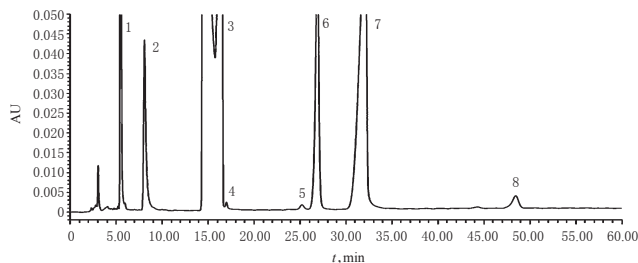
2.2.5 供试品溶液 精密称取样品适量,加入“2.2.1”项下稀释液溶解,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的供试品溶液。

2.2.6 对照溶液 精密量取“2.2.5”项下供试品溶液适量,加入“2.2.1”项下稀释液制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 μ g的对照溶液。

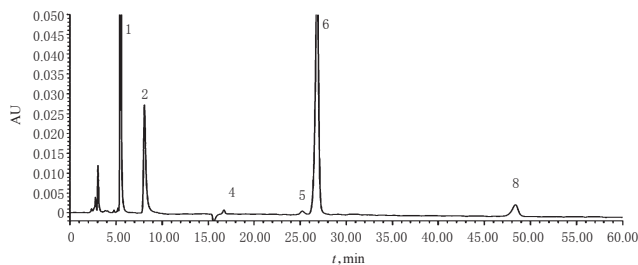
2.2.7 阴性对照溶液 以“2.2.1”项下稀释液为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

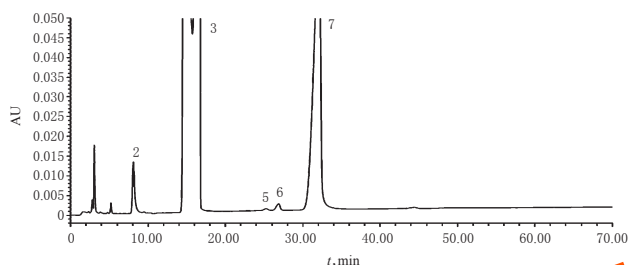
取“2.2”项下系统适用性试验用混合对照品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。



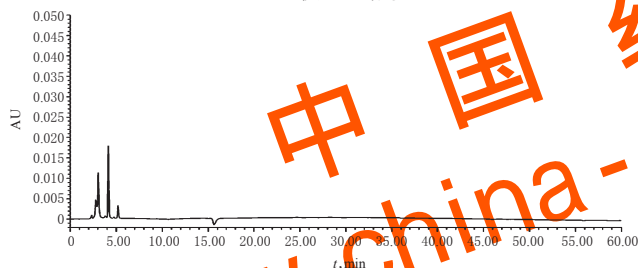
A. 系统适用性试验用混合对照品溶液



B. 混合对照品溶液



C. 供试品溶液



D. 阴性对照溶液

注: 1. 马来酸; 2. 3-氨基-2-哌啶酮; 3. 门冬氨酸; 4. 琥珀酸; 5. 苹果酸; 6. 富马酸; 7. 鸟氨酸; 8. β -门冬氨酰门冬氨酸

Note: 1. maleic acid; 2. 3-amino-2-piperidinone; 3. aspartate; 4. succinic acid; 5. malic acid; 6. fumaric acid; 7. ornithine; 8. β -aspartyl-aspartic acid

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability tests

由图1可知,各成分均能达到基线分离,溶剂、马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、门冬氨酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、鸟氨酸、 β -门冬氨酰门冬氨酸峰的分离度均大于1.58;马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、门冬氨酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、鸟氨酸、 β -门冬氨酰门冬氨酸峰的理论板数均不小于6 237。

2.4 破坏性试验

2.4.1 未破坏样品溶液 取样品100 mg,置于10 mL量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.2 酸破坏样品溶液 取样品100 mg,置于10 mL量瓶中,加入2 mol/L盐酸溶液2 mL,放置30 min后,加入2 mol/L氢氧化钠溶液2 mL中和,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.3 碱破坏样品溶液 取样品100 mg,置于10 mL量瓶中,加入2 mol/L氢氧化钠溶液2 mL,放置30 min后,加入2 mol/L盐酸溶液2 mL中和,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.4 氧化破坏样品溶液 取样品100 mg,置于10 mL量瓶中,加入30%过氧化氢溶液2 mL,放置30 min后,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.5 高温破坏(固体)样品溶液 取样品适量,置于120 °C下放置5 d,精密称取100 mg,置于10 mL量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.6 光照破坏样品溶液 取样品适量,置于4 500 lx光照下20 d,精密称取100 mg,置于10 mL量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释液溶解并稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

2.4.7 高温破坏(液体)样品溶液 取样品100 mg,置于10 mL量瓶中,加入少量“2.2.1”项下稀释液溶解,沸水浴中加热30 min,加入“2.2.1”项下稀释液稀释至刻度,制成每1 mL中含门冬氨酸鸟氨酸10 mg的溶液。

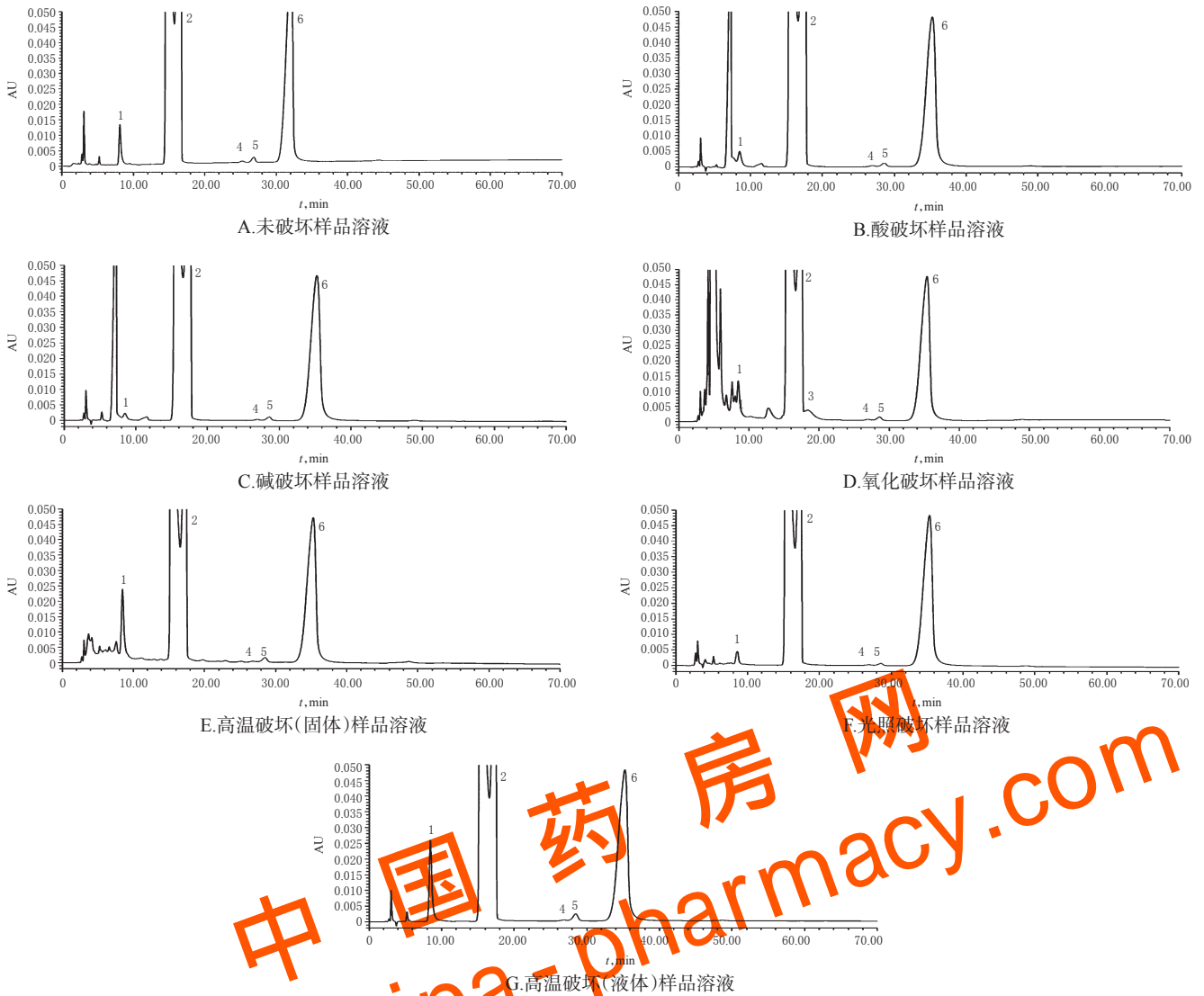
取上述各样品溶液20 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。由图2可知,在上述试验条件下,产生的所有降解产物峰均能与主成分峰实现有效分离,在高温破坏(固体)条件下可产生3-氨基-2-哌啶酮,在酸破坏和碱破坏条件下可产生苹果酸,在高温破坏(液体)条件下可产生3-氨基-2-哌啶酮和富马酸,在氧化破坏条件下可产生琥珀酸。

2.5 线性关系考察

精密量取“2.2.3”项下混合对照品贮备液0.5、0.7、1、2、2.5 mL,分别置于50 mL量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释液稀释至刻度,取适量按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x , μ g/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.6 定量限与检出限考察

分别精密量取“2.2.4”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检出限。结果,马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酰门冬氨酸的定量限分别为0.22、0.53、51.50、103.50、0.26、8.31 ng,检出限分别为0.13、0.26、10.30、20.70、0.13、2.08 ng。



注: 1. 3-氨基-2-哌啶酮; 2. 门冬氨酸; 3. 琥珀酸; 4. 苹果酸; 5. 富马酸; 6. 鸟氨酸

Note: 1. 3-amino-2-piperidinone; 2. aspartate; 3. succinic acid; 4. malic acid; 5. fumaric acid; 6. ornithine

图2 破坏性试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive tests

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
马来酸	$y=151\ 952x-77\ 628$	0.999 1	5.398~26.992
3-氨基-2-哌啶酮	$y=9\ 534x-37\ 807$	0.999 3	5.204~26.021
琥珀酸	$y=1\ 842.6x-2\ 493.7$	0.999 6	5.149~25.749
苹果酸	$y=2\ 253.6x+549.27$	0.999 3	5.174~25.874
富马酸	$y=166\ 712x-105\ 544$	0.999 3	5.164~25.823
β -门冬氨酸/门冬氨酸	$y=12\ 275x-560.37$	0.999 5	5.194~25.973

2.7 精密度试验

取“2.2.4”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸/门冬氨酸峰面积的RSD分别为0.1%、0.3%、0.9%、0.7%、0.3%、1.1% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.5”项下供试品溶液(批号:17371)适量,分别

于室温下放置0、1、2、4、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,3-氨基-2-哌啶酮、苹果酸、富马酸峰面积的RSD分别为1.01%、1.35%、1.56% ($n=5$),其他成分未检出,表明供试品溶液在室温下放置8 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

精密称取样品(批号:17371)适量,共12份,分别按“2.2.5”及“2.2.6”项下方法制备供试品溶液和对照溶液各6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中各杂质的含量。结果,3-氨基-2-哌啶酮、苹果酸、富马酸、最大未知杂质、未知杂质总量的平均含量分别为0.053%、0.061%、0.003 3%、0.097%、0.118%,RSD分别为0.5%、1.5%、0.9%、1.5%、2.0% ($n=6$),其他成分未检出,表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:17371)约0.2 g,精密称

定,共9份,分别置于20 mL量瓶中,加入一定量的混合对照品贮备液,加入“2.2.1”项下稀释液稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
马来酸	0	0.172 7	0.174 7	101.15	100.88	1.02
	0	0.172 7	0.176 7	102.31		
	0	0.172 7	0.175 8	101.79		
	0	0.215 9	0.216 1	100.09		
	0	0.215 9	0.214 4	99.30		
	0	0.215 9	0.215 3	99.72		
	0	0.259 1	0.260 5	100.54		
	0	0.259 1	0.263 6	101.73		
	0	0.259 1	0.262 5	101.31		
3-氨基-2-哌啶酮	0.105 6	0.168 1	0.275 0	100.77	100.55	0.37
	0.105 3	0.168 1	0.274 9	100.89		
	0.105 1	0.168 1	0.274 5	100.77		
	0.104 9	0.210 1	0.316 7	100.80		
	0.105 2	0.210 1	0.316 6	100.61		
	0.105 0	0.210 1	0.316 9	100.85		
	0.105 7	0.252 1	0.358 3	100.19		
	0.104 9	0.252 1	0.357 4	100.15		
	0.105 0	0.252 1	0.356 8	99.88		
琥珀酸	0	0.164 8	0.166 8	101.21	100.63	0.70
	0	0.164 8	0.166 4	100.97		
	0	0.164 8	0.164 8	100.00		
	0	0.206 0	0.206 5	100.24		
	0	0.206 0	0.204 7	99.36		
	0	0.206 0	0.207 1	100.53		
	0	0.247 2	0.251 0	101.53		
	0	0.247 2	0.250 6	101.37		
	0	0.247 2	0.248 3	100.44		
苹果酸	0.122 2	0.165 6	0.290 1	101.38	100.64	1.15
	0.121 9	0.165 6	0.286 4	99.33		
	0.121 6	0.165 6	0.289 8	101.57		
	0.121 4	0.207 0	0.333 9	102.65		
	0.121 8	0.207 0	0.327 0	99.13		
	0.121 6	0.207 0	0.330 2	100.77		
	0.122 3	0.248 4	0.370 4	99.87		
	0.121 4	0.248 4	0.369 7	99.95		
	0.121 6	0.248 4	0.372 7	101.08		
富马酸	0.006 619	0.165 3	0.172 3	100.23	100.73	0.38
	0.006 602	0.165 3	0.172 2	100.18		
	0.006 589	0.165 3	0.174 3	101.45		
	0.006 579	0.206 6	0.214 7	100.73		
	0.006 599	0.206 6	0.214 8	100.77		
	0.006 586	0.206 6	0.215 1	100.92		
	0.006 625	0.247 9	0.256 8	100.91		
	0.006 579	0.247 9	0.256 5	100.81		
	0.006 586	0.247 9	0.255 8	100.53		
β -门冬氨酸门冬氨酸	0	0.166 2	0.165 5	99.57	100.25	0.58
	0	0.166 2	0.165 2	99.39		
	0	0.166 2	0.166 5	100.18		
	0	0.207 8	0.208 9	100.52		
	0	0.207 8	0.209 5	100.81		
	0	0.207 8	0.208 5	100.33		
	0	0.249 3	0.250 1	100.32		
	0	0.249 3	0.250 1	100.32		
	0	0.249 3	0.248 8	99.79		

2.11 样品有关物质测定

取各批样品适量,分别按“2.2.5”及“2.2.6”项下方法制备供试品溶液和对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并按外标法计算样品中各已知杂质的含量,以自身对照法计算最大未知杂质与未知杂质总量,结果见表3。

2.12 不同方法测定样品有关物质的比较

采用本研究方法与2015年版《中国药典》(二部)方法,分别测定各批样品中各杂质的含量,结果见表4、表5。结果表明,本研究方法测定的3-氨基-2-哌啶酮、富马酸的含量与2015年版《中国药典》(二部)方法的测定结果相近,而本研究所用方法可检出苹果酸的含量。

3 讨论

3.1 杂质来源

门冬氨酸鸟氨酸是以门冬氨酸与盐酸鸟氨酸为原料,经成盐等工序合成制得^[10]。门冬氨酸以富马酸为原料,经蛋白酶催化及纯化等过程制备^[11]。马来酸为富马酸的顺式异构体,而苹果酸和琥珀酸为富马酸在生产反应中产生的副产物。门冬氨酸在制备或存放过程中可能会发生氨基酸脱水缩合反应,生成 β -门冬氨酸门冬氨酸。亦有文献报道,采用化学合成法,利用马来酸酐和氨水为主要原料合成门冬氨酸,其生产过程中会产生马来酸^[12]。鸟氨酸在存放过程中会产生自身缩合物3-氨基-2-哌啶酮。故本试验选择马来酸、3-氨基-2-哌啶酮、琥珀酸、苹果酸、富马酸、 β -门冬氨酸门冬氨酸6种杂质进行含量测定。

3.2 杂质结构与名称

2015年版《中国药典》(二部)收录的门冬氨酸鸟氨酸原料药中杂质II为门冬氨酸缩合物^[9]。门冬氨酸含有2个羧基和1个氨基,根据其结构式和氨基酸脱水缩合反应原理推测,发生脱水缩合反应时应有2种构型,分别为 α -门冬氨酸门冬氨酸(物质数字识别号码:58471-53-7)和 β -门冬氨酸门冬氨酸(物质数字识别号码:60079-22-3)。根据2015年版《中国药典》(二部)收录的门冬氨酸鸟氨酸原料药杂质II的结构式推测为 β -门冬氨酸门冬氨酸。

3.3 流动相的选择

本研究采用氨基键合硅胶为色谱柱填充剂,以0.02 mol/L磷酸二氢钾缓冲液[不同pH(5.6、6.3、6.25、6.2、6.15)]-乙腈(40:60, V/V)为流动相进行试验,发现流动相的pH值对出峰顺序及峰形影响较大,其pH值变化会使各物质的出峰顺序、时间和峰形产生明显变化。供试品溶液中门冬氨酸峰后有一倒峰,调整流动相pH后该倒峰变为正峰,与门冬氨酸峰相连,但不影响其他杂质分离。最初一溶剂峰(保留时间约为5.2 min)与马来酸峰较难分离,通过一系列试验比较发现,该溶剂峰与流

表3 样品有关物质测定结果($n=18, \%$)Tab 3 Results of related substance in samples ($n=18, \%$)

厂家	批号	马来酸	3-氨基-2-哌啶酮	琥珀酸	苹果酸	富马酸	β -门冬氨酸门冬氨酸	最大未知杂质	未知杂质总量
生产企业1	17371	未检出	0.053	未检出	0.054	0.002 5	未检出	0.097	0.110
	17372	未检出	0.051	未检出	0.071	0.002 9	未检出	0.110	0.110
	17373	未检出	0.056	未检出	0.065	0.003 4	未检出	0.100	0.120
生产企业2	67911	未检出	0.006	未检出	0.014	0.000 7	未检出	0.028	0.028
	67912	未检出	0.011	未检出	0.022	0.000 5	未检出	0.044	0.044
	67913	未检出	0.006	未检出	0.015	0.001 2	未检出	0.013	0.013

表4 生产企业1样品两种方法有关物质测定结果($n=18, \%$)Tab 4 Results of related substance in samples from manufacture 1 of two method ($n=18, \%$)

方法	批号	马来酸	3-氨基-2-哌啶酮	琥珀酸	苹果酸	富马酸	β -门冬氨酸门冬氨酸
本研究方法	17371	未检出	0.053	未检出	0.054	0.002 5	未检出
	17372	未检出	0.051	未检出	0.071	0.002 9	未检出
	17373	未检出	0.056	未检出	0.065	0.003 4	未检出
2015年版《中国药典》(二部)方法	17371	未检出	0.063	未检出	未检出	0.001 8	0.000 8
	17372	未检出	0.066	未检出	未检出	0.002 2	0.001 2
	17373	未检出	0.056	未检出	未检出	0.002 0	0.001 0

表5 生产企业2样品两种方法有关物质测定结果($n=18, \%$)Tab 5 Results of related substance in samples from manufacture 2 of two method ($n=18, \%$)

方法	批号	马来酸	3-氨基-2-哌啶酮	琥珀酸	苹果酸	富马酸	β -门冬氨酸门冬氨酸
本研究方法	67911	未检出	0.006	未检出	0.014	0.000 7	未检出
	67912	未检出	0.011	未检出	0.022	0.000 5	未检出
	67913	未检出	0.006	未检出	0.015	0.001 2	未检出
2015年版《中国药典》(二部)方法	67911	未检出	0.009	未检出	未检出	0.000 6	未检出
	67912	未检出	0.010	未检出	未检出	0.000 5	未检出
	67913	未检出	0.009	未检出	未检出	0.000 9	未检出

动相中的乙腈有关,使用水分含量较低或者质谱级别的乙腈可以减少溶剂峰数量,且可使溶剂峰与马来酸峰达到完全分离。

3.4 测定方法比较

2015年版《中国药典》(二部)门冬氨酸鸟氨酸原料药标准中有关物质项下同时测定了马来酸、富马酸、精氨酸、3-氨基-2-哌啶酮和 β -门冬氨酸门冬氨酸的含量^[9]。采用该色谱方法测定样品时,溶剂峰与马来酸峰存在重叠的现象,通过调整流动相比例、pH及更换色谱柱等均无法分开,以致无法测定样品中马来酸的含量。为此,本研究在参考上述色谱方法的基础上,改用两根氨基柱Phenomenex Luna NH₂(150 mm×4.6 mm, 3 μ m)串联后进行试验,发现溶剂峰与马来酸峰分离效果良好,分离度符合要求。

采用本研究方法与2015年版《中国药典》(二部)方法测定精氨酸的含量时发现,其在两种色谱条件下的响应值均较低,定量限与检出限分别为8.4 ng;6批样品中精氨酸均未检出。有文献报道,采用柱前衍生化RP-HPLC法,以9-芴甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)为柱前衍生化试剂,对鸟氨酸盐酸盐中潜在的12种氨基酸类杂质的衍生物进行测定,所建立的方法灵敏度、准确度高^[13]。本研究亦尝试采用柱前衍生化RP-HPLC法,以6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)为柱前衍生化试剂,对门冬氨酸鸟氨酸原料药进行衍生化处理后测定其中各杂质含量,方法学验证结果显示,精氨酸检测质量浓

度线性范围为1.032~20.658 μ g/mL($r=0.999 9$);定量限与检出限分别为0.5、0.3 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率为95.33%~98.17%(RSD=1.9%, $n=9$)。生产企业1的3批样品中精氨酸含量分别为0.000 5%、0.001 0%、0.000 8%,生产企业2的3批样品中精氨酸均未检出。3-氨基-2-哌啶酮、富马酸和 β -门冬氨酸门冬氨酸的含量与2015年版《中国药典》(二部)方法测定结果相近。

3.5 样品中有关物质测定结果比较

2家生产企业的样品质量存在一定差异,生产企业1的各杂质含量均比生产企业2高,特别是未知杂质的含量,已高于2015年版《中国药典》(二部)门冬氨酸鸟氨酸原料药中未知杂质的限度标准(0.1%)^[9]。其原因可能与企业的生产工艺有关,故建议有关企业改进其工艺。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性均较好,可用于门冬氨酸鸟氨酸原料药中有关物质的测定。

参考文献

- [1] Bundesministerium für Gesundheit und Soziale Sicherung. Deutsches arzneibuch[S]. Bonn: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart Govi-Verlag GmbH Frankfurt, 1991.
- [2] 顾大业,王成永,汪洪湖,等. 门冬氨酸鸟氨酸注射液工艺质量研究[J]. 淮南职业技术学院学报, 2014, 5(14): 65-68.
- [3] VILSTRUP H, AMODIO P, BAJAJ J, et al. Hepatic en-

HPLC法同时测定3种红景天药材中5种化学成分的含量^Δ

吕秀梅^{1,2*}, 范芳芳¹, 文 检¹, 范 刚¹, 张 静^{1#}, 张 艺¹(1.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2.重庆市江津区中医院药学部, 重庆 402260)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2515-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.16

摘要 目的:建立同时测定大花红景天、狭叶红景天和长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸含量的方法,并比较3种红景天药材中5种化学成分的含量差异。方法:采用高效液相色谱法测定含量,色谱柱为WondaSil C₁₈,流动相为乙腈-0.3%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为275 nm,柱温为25 ℃,流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL;采用GraphPad Prism 5.0软件对含量测定结果进行单因素方差分析和Tukey's多重比较。结果:没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸的检测进样量线性范围分别为0.020 48~0.614 4 μg($r=0.999\ 7$)、0.118~3.54 μg($r=0.999\ 5$)、0.010 84~0.325 2 μg($r=0.999\ 7$)、0.008 48~0.254 4 μg($r=0.999\ 5$)、0.004 1~0.123 μg($r=0.999\ 5$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为99.62%~104.92%(RSD=1.68%, $n=9$)、96.55%~100.69%(RSD=1.67%, $n=9$)、98.91%~103.39%(RSD=1.48%, $n=9$)、100.93%~104.98%(RSD=1.37%, $n=9$)、97.71%~103.89%(RSD=1.99%, $n=9$)。大花红景天中没食子酸、红景天苷、酪醇和咖啡酸含量均显著高于长鞭红景天,大花红景天中的红景天苷、咖啡酸含量均显著高于狭叶红景天,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结论:该方法简便可行、结果准确,可用于同时测定大花红景天、狭叶红景天和长鞭红景天药材中没食子酸、红景天苷、酪醇、咖啡酸、对香豆酸的含量。3种常见红景天药材中的化学成分含量存在较大差异,大花红景天中红景天苷的含量最高。

关键词 高效液相色谱法;单因素方差分析;Tukey's多重比较;红景天;没食子酸;红景天苷;酪醇;咖啡酸;对香豆酸;含量

Simultaneous Determination of 5 Chemical Components in 3 Kinds of *Rhodiola rosea* by HPLC

LYU Xiumei^{1, 2}, FAN Fangfang¹, WEN Jian¹, FAN Gang¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Yi¹ (1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Jiangjin District Hospital of TCM, Chongqing 402260, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid, salidroside, tyrosol, caffeic acid and *p*-coumaric acid in *Rhodiola crenulata*, *R. kirilowii* and *R. fastigiata*, and to compare the content difference of 5 chemical components in 3 kinds of *R. rosea*. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on WondaSil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The

cephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the European association for the study of the liver and the American association for the study of liver diseases[J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 715-735.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 化学药和生物制品卷[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 401.

[5] 陈孝治, 瑞甘[J]. 中南药学, 2004, 2(4): 254-255.

[6] FAROOQ A, HOQUE R, OUYANG X, et al. Activation of N-methyl-daspartate receptor downregulates inflammatory activity and liver inflammation via a β -arrestin-2 pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 307(7): G732-G740.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81203000)

* 药师, 硕士。研究方向: 中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail: lvxiu1@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail: zhangjingtcm@cduetcm.edu.cn

[7] 成军. 门冬氨酸鸟氨酸的肝病临床应用与研究进展[J]. 中国肝脏病杂志, 2015, 7(3): 49-51.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 43-44.

[9] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia* 40: volume 2[S]. Baltimore: United Book Press, 2017: 2868-2869.

[10] 孟福庆, 陶建国. 门冬氨酸鸟氨酸盐的制备[J]. 科技视界, 2014(13): 277.

[11] 徐克勋. 精细有机化工原料和中间体手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 1446-1447.

[12] 马江权, 冷一欣, 周宏斌, 等. DL-天冬氨酸合成工艺研究[J]. 江苏石油化工学院学报, 2000, 12(2): 8-11.

[13] 张梦悦, 宋晓妮, 李曼琳, 等. 柱前衍生化RP-HPLC法测定L-鸟氨酸盐酸盐的有关物质[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(4): 284-288.

(收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-06-19)

(编辑: 陈 宏)