

HPLC法测定注射用门冬氨酸鸟氨酸的含量和摩尔比

任连杰^{1,2*}, 张伟¹, 武晗燕¹, 高恒莹¹, 李群^{1#}(1.北京市药品检验所, 北京 100035; 2.国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0383-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.33

摘要 目的:建立测定注射用门冬氨酸鸟氨酸含量和摩尔比的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo HYPERSIL Aps-2 氨基柱,流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液,流速为 0.9 ml/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 200 nm,进样量为 20 μl。并将 HPLC 法所得结果与电位滴定法结果进行比较。结果:门冬氨酸鸟氨酸的检测质量浓度线性范围为 0.02~10.01 mg/ml($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD $<2\%$;回收率为 99.15%~100.15%,RSD=0.35%($n=9$)。3 批样品含量为 100.04%~100.64%,相对摩尔比为 0.982~0.989,含量测定结果与国家标准采用的电位滴定法测定结果相当。结论:该方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,适用于注射用门冬氨酸鸟氨酸的含量和摩尔比测定。

关键词 注射用门冬氨酸鸟氨酸;高效液相色谱法;含量;摩尔比

Content and Molar Ratio Determination of Ornithine Aspartate for Injection by HPLC

REN Lianjie^{1,2}, ZHANG Wei¹, WU Hanyan¹, GAO Hengying¹, LI Qun¹(1.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China; 2.Center for Drug Evaluation, CFDA, Beijing 100038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of the content and molar ratio of Ornithine aspartate for injection. METHODS: HPLC was performed on the column of Thermo HYPERSIL Aps-2 amino column with mobile phase of acetonitrile-0.05 mol/L Potassium dihydrogen phosphate solution, the flow rate was 0.9 ml/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 200 nm, and the injection volume of 20 μl. The results determined by HPLC and potentiometric titration were compared. RESULTS: The linear range of ornithine aspartate was 0.02-10.01 mg/ml($r=0.9999$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 99.15%-100.15% (RSD=0.35%, $n=9$). The content of 3 batches of Ornithine aspartate for injection was 100.04%-100.64% and molar ratio was 0.982-0.989. The content is similar to the results determined by potentiometric titration with national standards. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and sensitive, and suitable for the determination of the content and molar ratio of Ornithine aspartate for injection.

KEYWORDS Ornithine aspartate for injection; HPLC; Content; Molar ratio

门冬氨酸鸟氨酸是两种氨基酸成盐形成的离子化合物,能直接参与肝细胞代谢,并能激活肝脏解毒功能中的两个关键酶,因而能够协助清除对人体有害的自由基,增强肝脏的解毒功能,恢复机体能量平衡。注射用门冬氨酸鸟氨酸在临床上适用于急、慢性肝病^[1]包括肝硬化、脂肪肝、各型病毒性和中毒性肝炎^[2]以及高血氨症,特别是因肝脏疾病所引起的中枢神经系统症状的改善及肝性脑病^[3-4]的救治。注射用门冬氨酸鸟氨酸的现行国家药品标准(试行)WS-745(X-592)-2001采用电位滴定法对其进行含量测定,但是该方法操作复杂;且目前也有采用高效液相色谱(HPLC)法^[5]或氨基酸分析仪测定法对门

冬氨酸鸟氨酸进行含量测定的报道,但这两种方法均需柱前或柱后的衍生化。因此,为了简化其含量测定方法,更好地控制注射用门冬氨酸鸟氨酸的质量提供参考,笔者采用氨基柱,建立了测定注射用门冬氨酸鸟氨酸含量和门冬氨酸与鸟氨酸摩尔比的方法。

1 材料

1.1 仪器

U3000 型 HPLC 仪,包括二极管阵列检测器(DAD)和 Chromeleon 色谱工作站(美国 Dionex 公司);BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2010; 3 825-3 830.

[3] 吴洁,毕新岭,顾军.维A酸在银屑病患者中的应用[J].药学服务与研究,2007,7(4):245.

[4] 王文月,刘志宏,黄爱文,等.双波长 HPLC 法测定酸性龙胆合剂中龙胆苦苷和橙皮苷的含量[J].中国药房,2015,26(9):1 241.

* 副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:010-68921519。E-mail:bidclj@126.com

通信作者:副主任药师。研究方向:药物分析。电话:010-83223455

[5] 王承海,陈正艳,孙考祥,等.高效液相色谱法测定人血浆中帕瑞昔布和伐地昔布的浓度[J].中国新药与临床杂志,2012,31(6):304.

[6] 袁耀佐,钱文,张玫.HPLC 法同时测定复方盐酸克林霉素软膏中克林霉素和维A酸的含量及稳定性考察[J].中国抗生素杂志,2009,34(5):291.

[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:893,1 122-1 123.

(收稿日期:2015-06-28 修回日期:2015-10-26)

(编辑:刘柳)

1.2 药品与试剂

注射用门冬氨酸鸟氨酸(北京柏雅联合药物研究有限公司,批号:130201、130202、130203,规格:0.5 g/瓶);门冬氨酸鸟氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140749-200701,纯度:99.2%);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Thermo HYPERSIL Aps-2 氨基柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(50:50, V/V);流速:0.9 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:200 nm;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,理论板数按鸟氨酸峰计不低于2000,鸟氨酸与门冬氨酸色谱峰的分离度不低于2.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取门冬氨酸鸟氨酸对照品20 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,用50%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每1 ml中含门冬氨酸鸟氨酸2 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量(约相当于门冬氨酸鸟氨酸50 mg),置于25 ml量瓶中,加50%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 空白对照溶液 取50%乙腈溶液作为空白对照溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 空白干扰试验 因本品为门冬氨酸鸟氨酸的无菌冻干品,未添加任何辅料,故在测定过程中无辅料干扰。精密量取“2.2.3”项下空白对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,鸟氨酸和门冬氨酸两个色谱峰的出峰时间分别为8.473、12.597 min,两色谱峰之间的分离度为10.23,表明空白对照对本品含量测定无干扰。

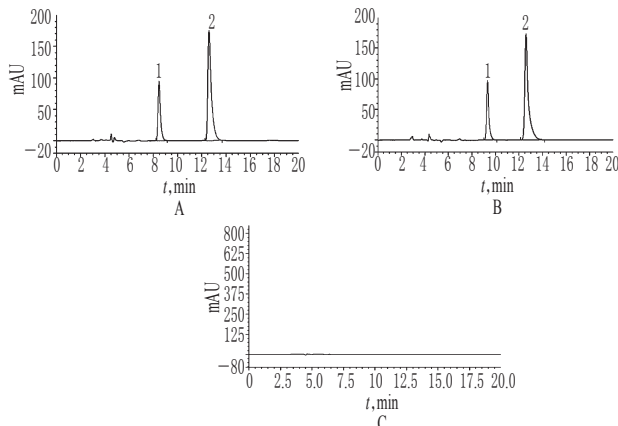


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.空白对照;1.鸟氨酸;2.门冬氨酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.blank control; 1.ornithine; 2.aspartate

2.3.2 破坏性试验 取样品(批号:130201)5份,每份约100 mg,精密称定,分别置于5个10 ml量瓶中,分别进行以下试验:(1)强酸破坏:在装有样品的10 ml量瓶中加入0.1 mol/L 盐酸溶液1 ml,放置2 h后加0.1 mol/L 氢氧化钠溶液适量调节pH至中性,用50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,备用;(2)强碱破坏:在装有样品的10 ml量瓶中加入1 mol/L 氢氧化钠溶液1 ml,放置2 h后加1 mol/L 盐酸溶液适量调节pH至中性,用50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,备用;(3)氧化破坏:在装有样品的10 ml量瓶中加30%过氧化氢溶液1 ml,放置2 h后用50%乙

腈溶液稀释至刻度,摇匀,备用;(4)高温破坏:将装有样品的10 ml量瓶置于120 ℃烤箱中放置1 h,取出,放冷,用50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,备用;(5)光破坏:将装有样品的10 ml量瓶置于4 500 lx光照下放置24 h后用50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,备用。精密量取上述5种溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱至门冬氨酸色谱峰保留时间的5倍(约63 min)。结果表明,经酸、碱、氧化、高温及光破坏后,供试品溶液检出的杂质峰个数及杂质含量均有不同程度的增加,但各杂质峰与门冬氨酸和鸟氨酸两个主峰均可达到基线分离,各杂质峰不干扰主峰的测定,详见表1。

表1 破坏性试验结果

Tab 1 Results of force degradation tests

试验	杂质增加个数	鸟氨酸理论板数	鸟氨酸与杂质峰分离度	鸟氨酸与后杂质峰分离度	门冬氨酸与杂质峰分离度	门冬氨酸与后杂质峰分离度
强酸破坏	12	5 641	4.04	6.72	6.49	12.44
强碱破坏	10	6 752	2.34	4.38	1.85	4.10
氧化破坏	9	5 494	3.49	2.56	1.56	6.71
高温破坏	15	7 211	2.48	4.37	2.17	1.85
光破坏	5	6 308	4.03	7.37	5.76	13.73

2.4 线性关系考察

精密称取门冬氨酸鸟氨酸对照品504.4 mg,置于25 ml量瓶中,用50%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液适量,加50%乙腈溶液稀释制成质量浓度分别为0.02、0.10、1.00、2.00、10.00 mg/ml的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以门冬氨酸鸟氨酸的质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、门冬氨酸与鸟氨酸的峰面积之和(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=2\ 292.8x+28.285$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,门冬氨酸鸟氨酸的检测质量浓度线性范围为0.02~10.01 mg/ml。

2.5 检测限和定量限

本品色谱中分别出现鸟氨酸和门冬氨酸两个色谱峰,其中鸟氨酸色谱峰较低。以鸟氨酸色谱峰按信噪比为3:1计算,门冬氨酸鸟氨酸的检测限为22 ng;以鸟氨酸色谱峰按信噪比为10:1计算,门冬氨酸鸟氨酸的定量限为44 ng。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定,记录峰面积。结果,鸟氨酸峰面积、门冬氨酸峰面积和两峰面积之和的RSD分别为0.25%、0.19%、0.21%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:130201)适量,分别于室温下放置0.2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,鸟氨酸峰面积、门冬氨酸峰面积和两峰面积之和的RSD分别为0.23%、0.34%、0.22%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:130201)适量(约相当于门冬氨酸鸟氨酸50 mg),精密称定,共6份,分别置于10 ml量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,门冬氨酸鸟氨酸的含量为100.24%,相对摩尔比为0.989, RSD分别为1.35%、0.69%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

本品为门冬氨酸鸟氨酸的无菌冻干品,未添加任何辅料,

故采用回收率试验。分别精密称取门冬氨酸鸟氨酸对照品16、20、24 mg,各3份,共9份,分别置于10 ml量瓶中,按“2.2.1”项下方法制备回收率试验工作溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
16.39	16.25	99.15		
16.68	16.57	99.34		
16.55	16.48	99.58		
20.68	20.71	100.15		
19.88	19.77	99.45	99.59	0.35
20.87	20.72	99.28		
24.11	24.01	99.59		
24.56	24.47	99.63		
24.67	24.70	100.12		

2.10 耐用性试验

取样品(批号:130201)适量,分别选择不同品牌色谱柱[色谱柱1为Thermo HYPERSIL Aps-2氨基柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);色谱柱2为Merck Purospher STAR NH2氨基柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)],改变流动相比例和色谱柱柱温等色谱条件,按“2.1”项下色谱条件进样测定,考察系统适用性,结果见表3。

表3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of robustness tests

耐用性考察项目	变化条件	鸟氨酸理论板数	分离度	含量,%	相对摩尔比
色谱柱	色谱柱1	6 953	10.23	100.18	0.989
	色谱柱2	6 639	8.95	100.34	0.991
流动相比例	45:55	7 264	7.52	100.10	0.989
	55:45	6 531	11.23	100.33	0.985
柱温,℃	35	7 018	10.18	100.14	0.989
	40	7 210	10.25	100.23	0.988
本文方法	无变化	6 953	10.23	100.18	0.989

2.11 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积之和按外标法计算含量,结果见表4[色谱柱1:Thermo HYPERSIL Aps-2氨基柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);色谱柱2:Merck Purospher STAR NH2氨基柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]。

表4 样品含量和摩尔比测定结果(n=3)

Tab 4 Results of contents determination and molar ratio of samples(n=3)

批号	项目	本文方法(色谱柱1)	本文方法(色谱柱2)	国家标准方法(电位滴定法)
130201	含量,%	100.18	100.34	100.81
	相对摩尔比	0.989	0.991	
130202	含量,%	100.04	100.06	100.27
	相对摩尔比	0.982	0.984	
130203	含量,%	100.64	100.67	100.41
	相对摩尔比	0.984	0.985	

3 讨论

3.1 摩尔比指标的纳入

门冬氨酸鸟氨酸溶解于50%乙腈溶液后,经氨基柱分离

为鸟氨酸和门冬氨酸两个色谱峰,故在计算其含量时是以两者的峰面积相加之和计算的。理论上,门冬氨酸鸟氨酸中鸟氨酸与门冬氨酸的摩尔比为1:1,但是在原料的制备过程中可能会因为条件的差异,引起两者摩尔比的波动,因此有必要引入摩尔比来控制产品的质量。可分别采用门冬氨酸和鸟氨酸两种氨基酸的对照品按外标法分别计算本品中门冬氨酸和鸟氨酸的绝对含量,进而计算得到绝对摩尔比。也可以采用供试品中门冬氨酸与鸟氨酸峰面积之比除以门冬氨酸鸟氨酸对照品中二者峰面积之比得到相对摩尔比。绝对摩尔比和相对摩尔比的计算结果基本一致。但相对摩尔比概念的引入,可直接反映门冬氨酸和鸟氨酸的相对含量,相对摩尔比既可用于终端控制,更主要的是可用于中间体的控制。将对照品中门冬氨酸与鸟氨酸的峰面积之比作为固定参考值,生产中可通过供试品峰面积的比较直观反映出产品实际质量。本试验给出的摩尔比结果均为相对摩尔比,并可根据产品实际情况及控制要求,将相对摩尔比规定限度为0.90~1.10。

3.2 测定方法的比较

门冬氨酸鸟氨酸的国家药品标准(试行)WS-745(X-592)-2001采用电位滴定法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量。通过将本试验方法与国家标准方法结果进行比较(见表4),表明两种方法结果没有显著差异。而且与国家标准方法相比,本试验方法专属性更强,并且还可在测定含量的同时测定门冬氨酸与鸟氨酸的摩尔比,适用性更强。另外,本试验方法与其他测定门冬氨酸鸟氨酸含量柱前衍生化法^[5-6]或柱后衍生化法^[7]比较,无需衍生化处理,操作更简单,不易受衍生化条件的影响。

综上所述,本方法简便、准确、专属性强、灵敏度高,适用于注射用门冬氨酸鸟氨酸的含量和摩尔比测定。

参考文献

- [1] 费平霞,杨学辉,文友民.3种保肝用药方案治疗乙型肝炎肝硬化的最小成本分析[J].中国药房,2010,21(38):3 558.
- [2] 董方亮,何文涛.门冬氨酸鸟氨酸联合前列地尔治疗重症肝炎的临床观察[J].中国药房,2014,25(44):4 153.
- [3] 程灿昌.门冬氨酸鸟氨酸治疗肝硬化伴发肝性脑病的疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2015,24(6):616.
- [4] 刘百舸,陈静.支链氨基酸联合门冬氨酸鸟氨酸治疗肝性脑病的疗效观察[J].中国实用神经疾病杂志,2014,17(16):102.
- [5] 张莉,黄哲苏,李海生.异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定门冬氨酸注射液含量[J].药物分析杂志,2008,28(7):1 174.
- [6] 段珊珊,董志.HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸注射液的含量[J].华西药学杂志,2014,29(4):480.
- [7] 贾婷婷,韩晓捷,黄哲甦.柱后衍生化高效液相色谱法测定门冬氨酸鸟氨酸颗粒剂的有关物质及含量[J].天津药学,2011,23(5):4.

(收稿日期:2015-05-18 修回日期:2015-09-23)

(编辑:刘柳)