

柱前衍生化 HPLC 法测定人纤维蛋白原中精氨酸的含量

赵艳红, 王 强, 陈兆梅(上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135)

摘要 目的:建立人纤维蛋白原中精氨酸的含量测定方法。**方法:**以丙氨酸为内标, 2,4-二硝基氟苯(DNFB)为柱前衍生剂, 50% 乙腈-0.05mol/L 醋酸盐缓冲液(35:65)为流动相, 紫外 362nm 处检测。**结果:**精氨酸在 0.16~0.80mg/mL 浓度范围内线性关系良好($r=0.9998$), 平均空白加样回收率为 102.4%, RSD 为 1.4%。**结论:**方法准确、简便, 费用低, 可用于人纤维蛋白原中精氨酸含量的控制。

关键词 精氨酸; 丙氨酸; 高效液相色谱法; 衍生化; 2,4-二硝基氟苯

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0111(2006)05-0334-02

Determination of arginine in human fibrinogen by HPLC with precolumn derivatization

ZHAO Yan-hong, WANG Qiang, CHEN Zhao-mei(Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd., Shanghai 200135, China)

ABSTRACT Objective: To develop a method for determination of arginine in human fibrinogen. **Methods:** The sample was mixed with alanine as the internal standard, derived by 2,4-dinitrofluorobenzene. The mobile phase was composed of 50% acetonitrile-0.05 mol/L acetate buffer(35:65). The UV detection wavelength was 362nm. **Results:** There was a good linear relationship with the range of 0.16~0.06mg/mL($r=0.9998$), average recovery of arginine was 102.4%, RSD was 1.4%. **Conclusion:** This method is accurate, simple, cheap, and can be used for determination of arginine in human fibrinogen.

KEY WORDS arginine; alanine, HPLC; derivation; 2,4-dinitrofluorobenzene

近年来,柱前衍生化 HPLC 法测定氨基酸的技术取得了很大的进展,并逐步在取代传统的氨基酸分析仪的方法。人纤维蛋白原为我们研制的新产品,在配方中加入了盐酸精氨酸,起助溶和干热保护的作用。作者采用高效液相色谱法,以 2,4-二硝基苯为衍生剂,测定人纤维蛋白原中精氨酸的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器和试剂 日立高效液相色谱仪, L-7100 泵, L-7420 紫外可见分光检测器, L-7610 真空脱气机。2,4-二硝基氟苯(中国医药上海化学试剂公司,分析纯);碳酸氢钠、丙氨酸(分析纯);精氨酸(日本味之素,分析纯,含量不少于 99.5%);乙腈(MERCK 公司,色谱纯)

1.2 配制试剂 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液(1%);碳酸氢钠溶液(0.5mol/L, pH 9.0);磷酸盐缓冲液(pH 7.0);醋酸盐缓冲液(0.05mol/L, pH 6.4);乙腈溶液(50%);精氨酸对照品溶液(0.8mg/mL);丙氨酸内标溶液(0.5mg/mL)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μ m);流动相: 50% 乙腈溶液-0.05mol/L 醋酸钠缓冲液(35:65);检测波长: 362nm;流速: 1.0mL/min;柱温: 常温;进样量: 20 μ L。

2.2 供试品的制备 按标示量用注射用水溶解冻干样品,精密量取 1mL 溶解后的样品于 100mL 容量瓶中,用生理盐水稀释至刻度,混匀备用。

2.3 对照品及样品的衍生化及色谱分析 精密量取 2.2 中处理后的样品与内标溶液各 1mL 置 10mL 量瓶中,加 0.5mol/L 的碳酸氢钠溶液(pH 9.0) 1mL, 1% DNFB 200 μ L 混匀, 60 $^{\circ}$ C 避光保温 1h 后,取出放冷,用磷酸盐缓冲液稀释至刻度。精密量取对照品溶液各 1mL 置 10mL 量瓶中,同法操作。取 20 μ L 注入高效液相色谱仪进行分析,以保留时间定性。见图 1,表 1。

2.4 干扰试验 按处方要求配制不含精氨酸的溶液,按 2.3 测定法测定,结果精氨酸和丙氨酸处无干扰峰出现,表明处方中其它成分对精氨酸的含量测定无干扰。

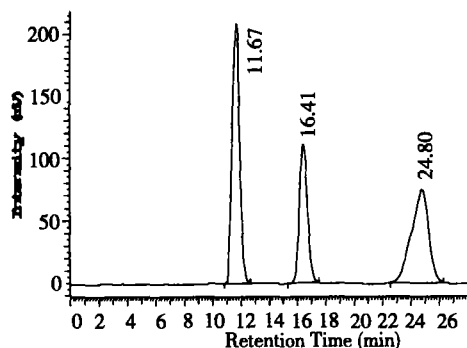


图 1 精氨酸 HPLC 色谱图

表 1 精氨酸待测品出峰时间 (min)

出峰时间	名称
11.67	DNFB 残留
16.41	精氨酸
24.80	丙氨酸

2.5 线性关系考察 精密量取精氨酸对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 进行衍生化。以不同浓度精氨酸峰面积与丙氨酸峰面积之比 Y 为纵坐标, 精氨酸实际质量浓度 X (mg/mL) 为横坐标, 进行线性回归得标准曲线: $Y = -0.02 + 0.899X, r = 0.9998$ 。结果表明精氨酸在 0.16 ~ 0.80mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密取对照品溶液 1.0mL, 重复进样 5 次, 分别测得峰面积比 0.7025、0.7017、0.7007、0.7033、0.7020, 平均值 0.7020, RSD 为 0.14%。

2.7 衍生化后样品稳定性试验 取衍生化后样品于 0、4、8、20、24h, 依法测定, 依次得峰面积比 0.3460、0.3436、0.3400、0.3418、0.3420, 平均值 0.3427, RSD 为 0.66%。

2.8 空白加样回收试验 精密加入处方量的 80%、100%、120% 的精氨酸于空白人纤维蛋白原中, 照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 衍生, 测定其含量, 计算空白加样回收率。见表 2。

表 2 精氨酸加样回收率试验结果

精氨酸实测浓度 (mg/mL)	精氨酸理论浓度 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.305	0.302	101.0		
0.395	0.380	103.9	102.4	1.4
0.463	0.452	102.4		

2.9 样品含量测定

表 3 样品含量测定结果 (n=3)

批号	含量 (mg/mL)
试 20030307	0.39
试 20030308	0.36
试 20030309	0.37

3 讨论

3.1 衍生化反应为氨基酸与 DNFB 在碱性条件下的缩合反应, 过量的 DNFB 及反应副产物的色谱峰对测定无干扰。

3.2 衍生化后样品在 (2 ~ 8℃) 冰箱放置过夜, 精氨酸含量基本不变; 衍生化样品至少可稳定 24h。

3.3 对流动相 50% 乙腈 - 0.05mol/L 醋酸盐缓冲液 (20 : 80; 35 : 65; 30 : 70) 的比例进行了筛选, 结果以 50% 乙腈 - 0.05mol/L 醋酸盐缓冲液 (35 : 65) 分离效果最理想, 最后选定为本试验流动相。

3.4 本法分离效果、重现性、稳定性均好, 专属性强, 可用于监控精氨酸的含量。

参考文献:

[1] 中国药典 2005 版[S]. 二部. 2005:588.
 [2] 李芳, 史宵燕. 2,4-二硝基苯衍生化法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱, 1995, 13(3):200.
 [3] 李瑜, 江勇, 李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液中 L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34(3):32.

收稿日期: 2005-12-16

排序分析法在医院药品库存管理中的应用

蒯丽萍¹, 于永生¹, 孙晓红², 陈盛新¹ (1. 第二军医大学药学院药事管理学教研室 上海 200433; 2. 沈阳军区联勤部药材仓库, 辽宁 沈阳 110003)

摘要 目的: 比较分析 ABC 法和排序分析法在控制药品库存费用方面的差别和优劣。方法: 收集一个 1000 张床位的教学医院 1 年的药品采购数据, 分别用 ABC 法和排序分析法进行处理。结果: 由 ABC 分析法得到该医院 2002 年度库存药品的 A 类, 共 215 个品种, 占全部库存品种的 17%; 库存量 7167 万个单位, 占库存总量的 46.41%, 金额 2.7598 亿元, 占全部库存额的 80.06%。由排序分析法得到库存药品重点管理品种共