

柱前衍生化 HPLC 测定人纤维蛋白粘合剂中盐酸精氨酸和亮氨酸的含量

赵艳红^{1,2}, 王强², 徐立³ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 上海新兴医药股份有限公司, 上海 200135; 3. 中国人民解放军第 113 医院药械科, 浙江 宁波 315040)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定人纤维蛋白粘合剂中盐酸精氨酸和亮氨酸的含量。**方法:** 采用 Shim-pack CLC-ODS 色谱柱, 柱前衍生化, 流动相 A 为 50% 乙腈, 流动相 B 为醋酸盐缓冲液; 检测波长 362 nm; 用外标法检测。**结果:** 本色谱条件下 2 种氨基酸衍生物能良好地分离, 衍生化试剂对氨基酸分析无干扰。平均回收率: 盐酸精氨酸为 102.8%, RSD 为 0.83%; 亮氨酸为 103.8%, RSD 为 0.92%。**结论:** 本方法准确, 方便, 费用低, 可用于人纤维蛋白粘合剂中 2 种氨基酸含量的控制。

关键词 盐酸精氨酸; 亮氨酸; 高效液相色谱法; 衍生化; 2,4-二硝基氟苯

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)03-0198-03

Determination of two amino acids in human fibrin sealant kit by pre-column derivatization HPLC

ZHAO Yan-hong^{1,2}, WANG Qiang², XU Li³ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Xinxing Medicine Co., Ltd., Shanghai 200135, China; 3. Department of Pharmacy, 113rd Hospital of PLA, Ningbo 315040, China)

ABSTRACT Objective To set up a method for determination of arginine and leucine in human fibrin sealant kit. **Methods** A Shim-pack CLC-ODS column was used after pre-column derivatization with 2,4-dinitrobenzene fluoride, with the mobile phase of 50% acetonitrile and 0.05 mol/L acetate buffer, and the UV detection wavelength was 362 nm. The contents were analyzed by external standard method. **Results** These two amino acid derivatives can be well separated under the chromatographic conditions. The average recovery was 102.8% (RSD = 0.83%) for Arg and 103.8% (RSD = 0.92%) for Leu. **Conclusion** The method is accurate, convenient, low-cost and suitable for determination of the two amino acids in human fibrin sealant kit.

KEY WORDS arginine hydrochloride; leucine; HPLC; derivatization; 2,4-dinitrofluorobenzene

人纤维蛋白粘合剂为新兴医药有限公司研制的新产品, 在配方中加入了盐酸精氨酸和亮氨酸, 起助溶和干热保护的作用。根据中国药典要求, 必须对注射剂中的添加剂进行含量测定, 本测定采用高效液相色谱法, 以 2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 为衍生剂, 柱前衍生化^[1,2]梯度洗脱测定人纤维蛋白粘合剂中盐酸精氨酸和亮氨酸的含量^[3]。

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, 盐酸精氨酸 (日本味之素, 分析纯, 含量不少于 99.5%), 亮氨酸 (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 试剂的配制 2,4-二硝基氟苯乙腈溶液 (1%); 碳酸氢钠溶液 (0.5 mol/L, pH 9.0); 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0); 醋酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 6.4); 乙腈溶液 (50%); 盐酸精氨酸对照品溶液 (0.8 mg/mL); 亮氨酸对照品溶液 (0.256 mg/mL)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack CLC-ODS 色谱柱 (6.0 mm ID × 150 mm, 5 μm); 流动相 A: 50% 乙腈溶液; 流动相 B: 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液; 检测波长: 362 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 常温; 进样量: 20 μL。采用梯度洗脱, 流动相比例见表 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的盐酸精氨酸、亮氨酸对照品各 80 mg、25.6 mg 置 100 mL 量瓶中加水适量, 超声溶解, 用水稀释至刻度, 摇

匀,作为对照品溶液。

表 1 流动相比例

时间 (m in)	流动相	
	A (%)	B (%)
0	35	65
16	35	65
20	80	20
38	80	20
40	35	65

2.3 供试品溶液的制备 按标示量用注射用水溶解冻干样品,精密量取 1 mL溶解后的样品加入 1.5% 磺基水杨酸溶液 4 mL混匀,室温放置 2 h 3 000 r/min离心 10 m in,取上清 1 mL于 10 mL容量瓶中,用生理盐水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 对照品及样品的衍生化及色谱分析 精密量取 2.3中处理后样品 1 mL置 10 mL量瓶中,加 0.5 mol/L的碳酸氢钠溶液 (pH9.0) 1 mL,1% DNFB150 μL混匀,60 °C避光保温 1 h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 1 mL置 10 mL量瓶中,同法操作。取 20 μL注入高效液相色谱仪进行分析,以保留时间定性。见图 1。

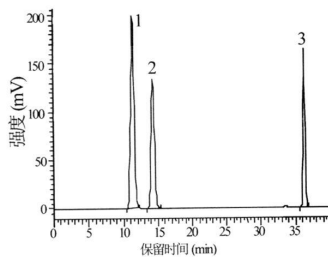


图 1 对照品色谱图

1- DNFB 残留; 2- 盐酸精氨酸衍生物; 3- 亮氨酸衍生物

2.5 干扰试验 按处方要求配制不含盐酸精氨酸和亮氨酸的溶液,按 2.4测定法测定,结果盐酸精氨酸和亮氨酸衍生物处无干扰峰出现,表明处方中其它成分对氨基酸的含量测定无干扰。

2.6 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL进行衍生化。按上述色谱条件和测定方法各进样 20 μL,进样测定。结果表明,2种氨基酸衍生物的浓度 X (mg/mL)与峰面积 Y之间呈良好的线性关系。见表 2。

2.7 进样精密度试验 取对照品溶液 1.0 mL,按上述色谱条件和测定方法连续进样 5次,每次 20 μL,测定各氨基酸的峰面积。见表 3。

2.8 空白加样回收试验 精密加入处方量的 80%, 100%, 120%的 2种氨基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 4。

表 2 盐酸精氨酸和亮氨酸线性范围与回归方程

组份	线性范围 (m g/mL)	回归方程	相关系数
盐酸精氨酸	0.16-0.80	$y = 1.7209 \times 10^5 + 4.1649 \times 10^6 x$	$r = 0.9998$
亮氨酸	0.051-0.256	$y = 1.0840 \times 10^5 + 2.7499 \times 10^6 x$	$r = 0.9988$

表 3 供试品溶液精密度试验结果

峰面积	平均值	RSD (%)
盐酸精氨酸		
4171122		
4140470		
4185949	4159957	0.89
4105875		
4196369		
亮氨酸		
2885569		
2841654		
2872698	2859310	0.84
2869256		
2827375		

表 4 加样回收率试验结果

组份	实测浓度 (m g/mL)	理论浓度 (m g/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸精氨酸	21.9	21.5	101.9		
	25.9	25.2	102.8	102.8	0.83
	31.7	30.6	103.6		
亮氨酸	6.5	6.2	104.8		
	8.5	8.2	103.7	103.8	0.92
	10.5	10.2	102.9		

2.9 衍生化后样品稳定性试验 取衍生化后对照样品于 0, 4, 8, 20, 24 h依法测定,结果见表 5。

表 5 供试品衍生化后溶液稳定性试验结果

组份	时间 (h)	峰面积	平均值	RSD (%)
盐酸精氨酸	0	4171122		
	4	4105875		
	8	4140470	4121957	0.82
	20	4085949		
	24	4106368		
亮氨酸	0	2885569		
	4	2841654		
	8	2826056	2847008	1.12
	20	2809063		
	24	2872698		

2.10 样品含量测定 取 2种氨基酸对照品及产品 3批,按含量测定法,用各峰面积的外标法计算各批中 2种氨基酸的含量。

表 6 3批样品含量测定结果 (mg/mL)

批号	盐酸精氨酸	亮氨酸
050301	24.9	8.1
050302	25.1	7.8
050903	24.7	7.9

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 因人纤维蛋白粘合剂蛋白含量高, 粘度大, 不去除蛋白影响含量测定, 故采用 1.5% 磺基水杨酸

去除, 方法简单, 方便;

3.3 衍生化产品在室温条件下 24 h 内能保持较好的稳定性;

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

参考文献:

- [1] 板蓝根中 L-精氨酸的柱前衍生化法 HPLC 分析 [J]. 西北药学杂志, 2004, 19(4): 157.
- [2] 中国药典 2005 版 [S]. 二部, 2005: 588
- [3] 丁建, 王玲娜, 苏丹. RP-HPLC 法测定眼氨肽滴眼液中 6 种氨基酸的含量 [J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12(5): 29.

收稿日期: 2008-12-31

(上接第 194 页)

表 2 血浆中盐酸米诺环素回收率考察 (n = 5)

加入浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (mean \pm SD, %)	RSD (%)
0.20	101.15 \pm 5.36	5.3
1.0	92.66 \pm 5.02	5.4
5.0	105.94 \pm 0.12	0.1

2.4 稳定性考察 本试验考察了米诺环素血浆样品经历 3 次冷冻 - 解冻循环的稳定性以及血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 的稳定性。配制米诺环素浓度为 0.2, 1.0, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆质控样品, 按“1.4”项下方法操作, 每一浓度水平进行 3 样本分析, 结果显示替米沙坦血浆样品经历 3 次冷冻 - 解冻循环后稳定, RSD 为 8.8%; 血浆样品经样品处理后室温放置 24 h 的稳定, RSD 为 7.1%。

2.5 药物动力学研究 10 例健康志愿者单剂量静脉滴注 200 mg 盐酸米诺环素, 结果平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。主要药代动力学参数见表 3。

表 3 10 名健康志愿者单剂量静脉滴注 200 mg 盐酸米诺环素后主要药代动力学参数

参数	静脉滴注 (200 mg)
$t_{1/2}$ (h)	18.10 \pm 4.07
C_{max} (mg/L)	4.744 \pm 0.887
t_{max} (min)	2
AUC_{0-72} ($\text{mg} \cdot \text{h/L}$)	75.71 \pm 10.68
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\text{mg} \cdot \text{h/L}$)	79.90 \pm 12.81

3 讨论

本实验中用 HPLC 测定志愿者体内血浆中盐酸米诺环素浓度, 结果表明, 该方法灵敏、精确、可靠, 可满足盐酸米诺环素药代动力学研究需要, 为临床设计给药方案提供实验依据。

盐酸米诺环素极易被氧化, 血浆样品提取过程中加少量抗坏血酸、L-半胱氨酸等稳定剂, 可减少被氧化破坏。同时在提取挥发过程中, 需控制水浴温度, 以防氧化破坏。采用加少量三氟乙酸流动相体系, 样品色谱分离峰形对称, 出峰时间短。

10 例健康受试者单剂量静脉滴注 200 mg 盐酸米诺环素, 2 h 滴注完毕, 主要药代动力学参数 $t_{1/2}$ 为 18.1 h, C_{max} 为 4.744 mg/L 与文献报道一致^[1-3]。

参考文献:

- [1] 何菊英, 刘松青, 夏培元, 等. 单次与多次静脉滴注盐酸米诺环素在健康志愿者的药动学 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(10): 824
- [2] Orti V, Audran M, Gilbert P, et al. High-performance liquid chromatographic assay for minocycline in human plasma and parotid saliva [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 738(2): 357.
- [3] 周玲洁, 顾丽华, 王以俭, 等. 米诺环素注射剂的药动学 [J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(10): 798

收稿日期: 2008-12-25

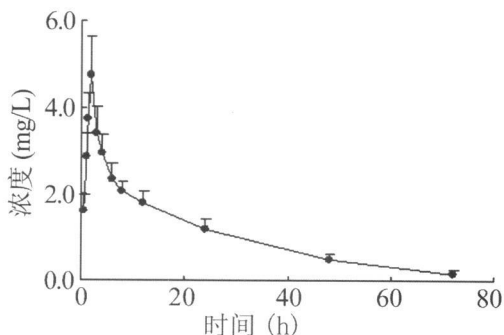


图 2 10 名健康受试者单剂量静脉滴注 200 mg 盐酸米诺环素后的药 - 时曲线