

毛细管电泳法测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中2种主成分的含量^Δ

周洁^{1*}, 左利民¹, 王智亮², 姜威¹, 任连杰³, 山广志^{1#}(1.中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京100050; 2.潍坊市人民医院, 山东潍坊 261041; 3.北京市药品检验所, 北京 100035)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2106-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.33

摘要 目的:建立同时测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中2种主成分含量的方法。方法:采用毛细管电泳法。分离柱为未涂层熔融石英毛细管柱,运行缓冲液为40 mmol/L硼砂缓冲液(pH=9.22),样品缓冲液为4 mmol/L硼酸缓冲液(pH=6.97),温度为20 ℃;进样方式为压力进样,进样压力为0.5 psi,进样时间为5 s,分离电压为15 kV,检测波长为220 nm。结果:L-谷氨酰胺和呱仑酸钠质量浓度分别在0.332 5~13.30 mg/ml($r=0.999\ 3$)和1.00~40.0 μg/ml($r=0.998\ 3$)范围内与各自峰面积呈良好的线性关系;精密性、稳定性试验的RSD≤2.83%;平均加样回收率分别为98.33%(RSD=4.50%, $n=9$)和100.03%(RSD=4.98%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,结果灵敏、准确性高,可用于L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中2种主成分的含量测定。

关键词 毛细管电泳;L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒;L-谷氨酰胺;呱仑酸钠;含量测定

Content Determination of 2 Kinds of Main Components in L-glutamine and Sodium Gualenate Granules by Capillary Electrophoresis

ZHOU Jie¹, ZUO Li-min¹, WANG Zhi-liang², JIANG Wei¹, REN Lian-jie³, SHAN Guang-zhi¹(1.Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2.Weifang People's Hospital, Shandong Weifang 261041, China; 3.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 2 kinds of main components in L-glutamine and sodium gualenate granules. METHODS: Capillary electrophoresis was conducted. The separation column was uncoated silica capillary column with the running buffer of 40 mmol/L borax buffer solution (pH=9.22) and the sample buffer of 4 mmol/L boric acid buffer solution (pH=6.97); the temperature was 20 ℃; the injection pressure was 0.5 psi and injection time was 5 sec; the separation voltage was 15 kV and detection wavelength was 220 nm. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of L-glutamine in the range of 0.332 5-13.30 mg/ml ($r=0.999\ 3$) and sodium gualenate was in the range of 1.00-40.0 μg/ml ($r=0.998\ 3$). The RSDs of precision and stability test were no more than 2.83%; the average recovery was respectively 98.33% (RSD=4.50%, $n=9$) and 100.03% (RSD=4.98%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, accurate and can be used for the content determination of 2 kinds of main components in L-glutamine and sodium gualenate granules.

KEYWORDS Capillary electrophoresis; L-glutamine and sodium gualenate granules; L-glutamine; Sodium gualenate; Content determination

L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒(L-glutamine and sodium gualenate granules, 商品名:麦滋林)是日本寿制药株式会社生产的以L-谷氨酰胺与呱仑酸钠为主成分的复方制剂,主要用于治疗口腔溃疡^[1]、胃炎、胃溃疡和十二指肠溃疡^[2]等疾病。

因L-谷氨酰胺与呱仑酸钠极性不同,且含量相差悬殊,同时测定二者含量相对困难。在L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒进口注册标准^[3]中,分别采用定氮法和高效液相色谱(HPLC)法对L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的含量进行测定。另有文献报道,利用紫外分光光度法^[4]、反相高效液相色谱(RP-HPLC)^[5]等方法检测呱仑酸钠含量,采用HPLC法^[6]、纸层析法^[7]、毛细管电泳

法^[8]等方法以及借助氨基酸自动分析仪^[9]检测L-谷氨酰胺的含量。最近有研究人员采用离子对HPLC法,以乙腈-0.05%癸烷磺酸钠溶液为流动相,实现了L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中L-谷氨酰胺与呱仑酸钠含量的同时测定^[10]。

毛细管电泳法以绿色、经济、环保、简便等特点广泛应用于药物分析的各个领域,尤其适合带电物质的分离,是传统RP-HPLC方法的有效补充。本文尝试采用成本低、柱效高的毛细管电泳法同时测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中2种主要成分的含量,以为国内产品的药品标准提高,以及极性较强且酸碱性相差悬殊的复方制剂的开发、质量研究与控制提供参考和借鉴。

1 材料

P/ACE MDQ毛细管电泳系统(美国Beckman Coulter有限公司);CP214型电子天平(美国奥豪斯仪器有限公司);Integral 10型超纯水仪(德国Merck Millipore公司);无涂层石英毛细管

^Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2012ZX09301002)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:010-63021345。E-mail: alisazhoujie@sina.com

通信作者:助理研究员。研究方向:药物分析及质量研究。电话:010-63021345。E-mail: imbsgz@gmail.com

细管柱(河北永年光纤纤维厂);Seven Easy S20 pH计(瑞士梅特勒-托利多有限公司)。

L-谷氨酰胺对照品(美国 Agilent Technologies 有限公司,批号:BCBG1414V,纯度:100.0%);呱仑酸钠对照品(日本寿制药株式会社,批号:I07N,纯度:100.6%);L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒样品(日本寿制药株式会社,批号:S49P、S56Q,规格:0.67 g/袋,每袋含L-谷氨酰胺663.3 mg、呱仑酸钠2.0 mg);十水合四硼酸钠、硼酸均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 电泳条件

色谱柱:采用无涂层石英毛细管柱(总长度60.2 cm,有效长度50 cm,内径50 μm);运行缓冲液:40 mmol/L 硼砂缓冲液(pH=9.22);样品缓冲液:4 mmol/L 硼酸缓冲液(pH=6.97);温度:20 ℃;进样方式:压力进样;进样压力:0.5 psi;进样时间:5 s;分离电压:15 kV;检测波长:220 nm。

试验前石英毛细管柱分别用0.1 mol/L 氢氧化钠冲洗20 min,超纯水冲洗5 min,运行缓冲液冲洗5 min,以保证毛细管柱充分清洗并平衡。每次进样前依次用0.1 mol/L 氢氧化钠、超纯水、运行缓冲液各冲洗3 min,以保证待测样品的重复性。

2.2 溶液的配制

2.2.1 运行缓冲液(空白溶液)的配制 称取十水合四硼酸钠380.0 mg,加100 ml 超纯水溶解,摇匀,调pH至9.22,用0.22 μm滤膜过滤,即得40 mmol/L 运行缓冲液。

2.2.2 样品缓冲液的配制 称取硼酸120.0 mg,加500 ml 超纯水溶解,摇匀,调pH至6.97,用0.22 μm滤膜过滤,即得4 mmol/L 样品缓冲液。

2.2.3 系列混合对照溶液的制备 称取呱仑酸钠对照品25.0 mg,置于50 ml 量瓶中,加样品缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm滤膜过滤。称取L-谷氨酰胺对照品332.5 mg,置于25 ml 量瓶中,精密加入上述呱仑酸钠溶液2.0 ml,加样品缓冲液溶解并稀释至刻度,即得含13.30 mg/ml L-谷氨酰胺与40.0 μg/ml 呱仑酸钠的混合对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液适量,加样品缓冲液逐级稀释至L-谷氨酰胺质量浓度分别为13.30、6.650、3.325、0.665 0、0.332 5 mg/ml,呱仑酸钠质量浓度分别为40.0、20.0、10.0、2.00、1.00 μg/ml的系列混合对照溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 分别称取批号为S49P、S56Q的2批L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒样品0.670 0 g,分别置于100 ml 量瓶中,加样品缓冲液溶解并稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm滤膜过滤;精密量取5.0 ml,置于10 ml 量瓶中,加样品缓冲液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

精密吸取空白溶剂(样品缓冲液)、3.325 mg/ml L-谷氨酰胺与10.0 μg/ml 呱仑酸钠的混合对照品溶液和批号为S56Q的供试品溶液,分别注入毛细管电泳仪检测。色谱见图1。结果,L-谷氨酰胺对照品迁移时间为6.6 min,呱仑酸钠对照品迁移时间为7.9 min;空白溶液在相应位置未见色谱峰,不干扰L-谷氨酰胺和呱仑酸钠的测定。

2.4 线性范围考察

取L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的系列混合对照溶液适量,分

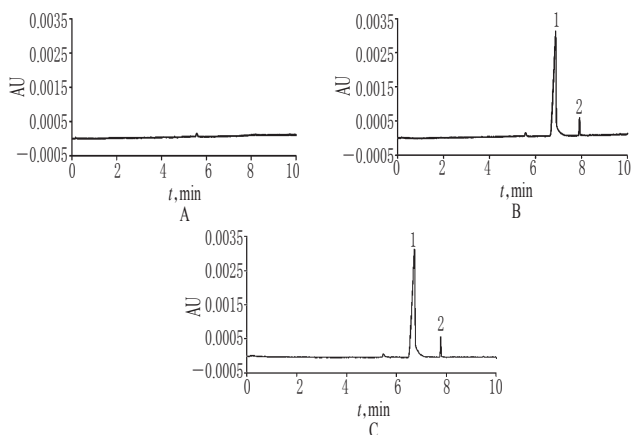


图1 毛细管电泳色谱图

A.空白溶液;B.混合对照品溶液;C.供试品(S56Q)溶液;1.L-谷氨酰胺;2.呱仑酸钠

Fig 1 Capillary electrophoresis chromatograms

A.blank solution;B.mixed reference solution;C.test sample(S56Q) solution;1.L-glutamine;2.sodium gualenate

别按“2.1”项下电泳条件进样,记录色谱峰,以质量浓度(x , mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得L-谷氨酰胺和呱仑酸钠的回归方程为 $y=1.34 \times 10^{-4}x-0.12$ ($r=0.9983$), $y=8.26 \times 10^{-4}x+0.36$ ($r=0.9993$)。结果表明,L-谷氨酰胺和呱仑酸钠质量浓度分别在0.332 5~13.30、1.00~40.0 μg/ml范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 检测限和定量限

以信噪比为10计算最低定量限(LOQ),以信噪比为3计算最低检出限(LOD)。结果,L-谷氨酰胺的LOQ为66.50 μg/ml,LOD为33.25 μg/ml;呱仑酸钠的LOQ为1.00 μg/ml,LOD为0.500 μg/ml。

2.6 精密度试验

取含有5.50 mg/ml L-谷氨酰胺与16.0 μg/ml 呱仑酸钠的混合对照品溶液,按“2.1”项下电泳条件,连续进样5次,记录峰面积。结果,L-谷氨酰胺峰面积的RSD为2.53%($n=5$),呱仑酸钠峰面积的RSD为1.55%($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密量取同一批样品(批号:S49P)适量,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下电泳条件进样,记录峰面积。结果,L-谷氨酰胺峰面积的RSD为2.83%($n=5$),呱仑酸钠峰面积的RSD为1.73%($n=5$),表明供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取“2.2.4”项下供试品溶液5.0 ml(批号:S49P)共9份,置于10 ml 量瓶中,分别加入质量浓度为5.50 mg/ml的L-谷氨酰胺与16.0 μg/ml的呱仑酸钠混合对照品溶液各1.8、3.0、4.2 ml,加样品缓冲液稀释至刻度,摇匀,每个质量浓度平行3份。按“2.1”项下电泳条件进样,计算加样回收率,结果详见表1。

2.9 样品含量测定

取2批供试品(批号:S49P、S56Q),按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下电泳条件,分别进样测定,按外标法计算2批样品中L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的含量。结果,批号

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 The result of recovery test(n=9)

待测成分	已知含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
L-谷氨酰胺	15.81	9.90	26.69	109.9	98.33	4.50
	15.81	9.90	25.81	101.0		
	15.81	9.90	25.72	100.2		
	15.81	16.50	32.15	99.0		
	15.81	16.50	32.53	101.4		
	15.81	16.50	32.81	103.0		
	15.81	23.10	38.57	98.5		
	15.81	23.10	37.18	92.5		
	15.81	23.10	37.67	94.6		
	15.81	23.10	37.67	94.6		
呱仑酸钠	56.25	28.80	84.88	99.4	100.03	4.98
	56.25	28.80	87.00	106.8		
	56.25	28.80	85.59	101.9		
	56.25	48.00	100.08	91.3		
	56.25	48.00	101.84	95.0		
	56.25	48.00	103.96	99.4		
	56.25	67.20	120.57	95.7		
	56.25	67.20	121.28	96.8		
	56.25	67.20	122.60	98.7		
	56.25	67.20	122.60	98.7		

为S49P的供试品中含L-谷氨酰胺占标示量的100.3%,含呱仑酸钠占标示量的100.0%;批号为S56Q的供试品中含L-谷氨酰胺占标示量的103.2%,含呱仑酸钠占标示量的109.0%。该结果与按进口注册标准方法检测所得结果基本一致。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

L-谷氨酰胺和呱仑酸钠在水溶液中分别带正电荷和负电荷,两者极性均较大,难以用传统的RP-HPLC法进行分离。本文采用毛细管电泳法,依靠电泳和电渗两种作用,利用40 mmol/L硼砂缓冲液(pH=9.22),使极性相反的L-谷氨酰胺和呱仑酸钠得到了良好的分离和检测。

3.2 检测波长的选择

呱仑酸钠在246、293、370 nm波长处均有最大特征吸收峰,通常选择290 nm作为其检测波长^[7],但L-谷氨酰胺在此波长下无紫外吸收。为了满足呱仑酸钠与L-谷氨酰胺的同时测定,故选择较低的220 nm波长作为本研究的检测波长,保证了二者响应良好,实现了L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的同时检测。

3.3 运行缓冲液pH的选择

硼酸盐缓冲液因pH缓冲范围较宽、紫外吸收较低而成为毛细管电泳试验中较常用的分离缓冲体系。本试验结合L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的pK_a值对运行缓冲液浓度及其pH进行选择和优化。最终,选择40 mmol/L硼砂缓冲液(pH=9.22)作为本研究运行缓冲液。

3.4 样品缓冲液pH的选择

利用毛细管电泳检测时,要求样品缓冲液电导值≤运行缓冲液电导值,以促使电泳区带聚焦,获得良好峰形^[13]。本试验利用4 mmol/L硼酸缓冲液(pH=6.97)作为样品缓冲液,其浓度为运行缓冲液浓度的1/10。样品缓冲液电导值<运行缓

冲液电导值,可使待测物保持良好峰形;同时,能确保样品缓冲液pH与运行缓冲液pH保持一定的差异,以利于样品分离和检测。

3.5 分离电压的选择

分离电压可直接影响电渗流、迁移时间、灵敏度和分离度等因素^[13-14]。本试验比较了10、15、20 kV分离电压对L-谷氨酰胺与呱仑酸钠分离度的影响。结果表明,随着分离电压的增大,L-谷氨酰胺与呱仑酸钠的迁移时间减小,同时L-谷氨酰胺峰展宽;当电压为15 kV时,2种成分具有良好的分离度、迁移时间较短,且基线平稳,峰形相对较好。因此,确定分离电压为15 kV。

综上所述,本文建立的毛细管电泳法操作简便、准确性高、专属性强,能够满足复方制剂中L-谷氨酰胺与呱仑酸钠含量的同时测定。

参考文献

- [1] 陈红,白学敏,孙建枢,等.麦滋林-S口腔溃疡膜剂的研制及其质量控制[J].中国临床药学杂志,2006,15(2):120.
- [2] 彭兴盛,叶晓霞.麦滋林颗粒剂中奥磺酸钠的HPLC测定[J].中国医药工业杂志,2005,36(6):361.
- [3] 国家食品药品监督管理局.L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒进口注册标准:JX20030254[S].2003.
- [4] 佟爱东,李薇,廖燕玲,等.分光光度法测定麦滋林-S颗粒中水溶性奥的含量[J].药物分析杂志,1994,14(5):55.
- [5] 张占辉,刘庆彬,薄海静,等.高效液相色谱法测定呱仑酸钠的含量及有关物质[J].药物分析杂志,2001,21(5):339.
- [6] Arnal JF, Münzel T, Venema RC, et al. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(6): 2 565.
- [7] 王霞,张伟国.发酵液中L-谷氨酰胺的定性定量测定[J].食品与生物技术学报,2008,27(6):111.
- [8] Kaneta T, Maeda H, Miyazaki M, et al. Determination of amino acids in urine by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection[J]. *J Chromatogr Sci*, 2008, 46(8): 712.
- [9] Van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, et al. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(1):96.
- [10] 张帆,罗域城.反相高效液相色谱法同时测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中L-谷氨酰胺和呱仑酸钠的含量[J].药物分析杂志,2010,30(8):1 448.

(收稿日期:2014-06-23 修回日期:2015-03-29)

(编辑:申琳琳)