

茛三酮柱后衍生法测定丙氨酰-谷氨酰胺的含量

诸敏¹, 黄明法²(1.杭州师范大学附属医院, 杭州 310015; 2.浙江省食品药品检验所, 杭州 310015)

摘要: 目的 建立茛三酮柱后衍生氨基酸分析仪测定 *N*(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺(*L*-Ala-*L*-Glu)含量的方法。方法 根据 *L*-Ala-*L*-Glu 与茛三酮反应后溶液在 570 nm 处有最大吸收的原理, 以钾钠缓冲液为流动相, 将 *L*-Ala-*L*-Glu 洗脱后, 与茛三酮进行柱后衍生反应, 生成可以被分光光度计检测的有色物质, 氨基酸分析仪测定 *L*-Ala-*L*-Glu 的含量。结果 *L*-Ala-*L*-Glu 在 1~20 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.9979$), 低、中、高 3 种浓度的回收率分别为 94.5%, 97.6% 和 98.7%; RSD 分别为 0.52%, 0.10% 和 0.06%。结论 本法操作简单, 分离度良好, 结果准确可靠, 可用于 *L*-Ala-*L*-Glu 的含量测定。

关键词: *N*(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺; 茛三酮; 柱后衍生法

中图分类号: R917.796

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)07-0669-02

Determination of *N*(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine by Post-Column Derivatization with Ninhydrin

ZHU Min¹, HUANG Mingfa²(1.Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China; 2.Zhejiang Province Institute of Drug Control, Hangzhou 310015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method using post-column derivatization with ninhydrin for determination of *N*(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine(*L*-Ala-*L*-Glu). **METHODS** According to principle of solution having maximum absorption in 570 nm, potassium sodium buffer as mobile phase, *L*-Ala-*L*-Glu was eluted and reacted with ninhydrin, the production can be detected by spectrophotometer, amino acid analyzer determined the content of *L*-Ala-*L*-Glu. **RESULTS** The linear relation was good in the range of 1~20 mg·L⁻¹ ($r=0.9979$). The recoveries of low, middle and high concentration were 94.5%, 97.6% and 98.7% with the RSD of 0.52%, 0.10% and 0.06%, respectively. **CONCLUSION** This method is simple, separating degree is good, results are accurate and reliable, and can be used in the determination of *L*-Ala-*L*-Glu.

KEY WORDS: *N*(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine; ninhydrin; post-column derivatization

N(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺在体内可分解为 *L*-谷氨酰胺和 *L*-丙氨酸, 而 *L*-谷氨酰胺是人体自身含有的一种氨基酸, 参与多种组织代谢。当人体处于各种应急状态如创伤、感染时, 肌体对 *L*-谷氨酰胺的需求大大增加, 须及时从体外给予补充。但是, *L*-谷氨酰胺溶解度低且不稳定, 而 *N*(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺易溶于水, 体内代谢后产生的 *L*-谷氨酰胺使肠外营养液补充谷氨酰胺成为可能。

目前, 测定 *N*(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺的常用方法是使用氨基酸柱^[1]直接进样, 但需要较长时间平衡, 灵敏度有限; 也有采用柱前衍生化 HPLC^[2]进行测定的, 但衍生化的操作较为复杂, 且对色谱柱损伤较大。本试验采用丙氨酰-谷氨酰胺洗脱后在柱后与茛三酮进行衍生反应, 氨基酸分析仪直接测定结果, 操作简单, 结果准确可靠。

1 仪器、药品与试剂

1.1 仪器

SYKAM 433D 氨基酸分析仪(德国赛卡姆公司)。

1.2 药品与试剂

N(2)-*L*-丙氨酰-*L*-谷氨酰胺对照品(丙氨酰-谷氨酰胺, *L*-Ala-*L*-Glu, 中国药品生物检定所, 批号: 140702-200501, 纯度: 99.9%), 丙氨酰-谷氨酰胺注射液(四川科伦药业股份有限公司, 批号: F091201C1), 复方氨基酸注射液(华瑞制药有限公司, 批号: 80DC157), 茛三酮(上海三爱思厂), 三水乙酸钠、醋酸钾、乙酸、苯酚、甲醇(上海国药集团化学有限公司), 所有试剂均为分析纯。钾钠缓冲液(三水乙酸钠 272 g 和醋酸钾 196 g 溶于适量去离子水, 再加入乙酸 200 mL, 用去离子水定容到 1 L)。茛三酮溶液(茛三酮 20 g, 苯酚 2 g, 用钾钠缓冲盐 400 mL 和甲醇 600 mL 溶解)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

磺酸基强酸性阳离子交换树脂柱 PEEK(4.6 mm×150 mm), 柱温 130 °C, 检测波长 570 nm, 进样量 50 μL, 流动相为钠钾缓冲液, 流速 0.45

基金项目: 浙江省科技厅项目(2008C30027)

作者简介: 诸敏, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0571)88303669

E-mail: zhumin016@126.com

$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱压 3.5 MPa。茚三酮溶液流速 $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2 标准溶液的配制

精密称取对照品丙氨酸-谷氨酰胺 20 mg, 用 1% 磺基水杨酸定容至 100 mL, 配制成 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 方法专属性

取对照品和供试品适量, 用流动相溶解并稀释, 进样 $50 \mu\text{L}$ 。结果见图 1, 丙氨酸-谷氨酰胺的峰形对称, 干扰较小, 结果符合要求。

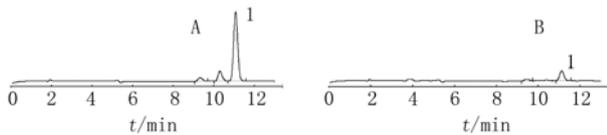


图 1 丙氨酸-谷氨酰胺色谱图

A-对照品; B-注射液; 1-丙氨酸-谷氨酰胺

Fig 1 Chromatograms of *L-Ala-L-Glu*

A-standard of *L-Ala-L-Glu*; B-injection of *L-Ala-L-Glu*; 1-*L-Ala-L-Glu*

2.4 标准曲线的制备

精密吸取丙氨酸-谷氨酰胺对照品溶液 0.25, 1.25, 2.5, 3.75, 5 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加 1% 磺基水杨酸至刻度线, 配制成终浓度为 1, 5, 10, 15, 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。分别进样 $50 \mu\text{L}$, 记录峰面积。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线方程: $y=330.58x+178.5$, $r=0.9979$ 。即 *L-Ala-L-Glu* 在 $1\sim 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 线性关系良好。

2.5 仪器精密度

取 5, 10, 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 种浓度对照品溶液, 分别连续进样 4 次, 其精密度分别为 0.52%, 0.10%, 0.06%。

2.6 加样回收率

精密称取已知含量的样品, 分成 3 组, 每组 3 份, 各组精密加入一定量的浓度分别为 5, 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丙氨酸-谷氨酰胺对照品溶液, 混匀后进样, 记录色谱峰, 代入回归议程, 计算平均加样回收率为 $(100.3\pm 0.7)\%$, RSD 为 0.72%。

2.7 稳定性

取丙氨酸-谷氨酰胺对照品溶液适量, 分别于 0, 1, 2, 4, 6 h 进样, 记录峰面积, 测得 RSD 为 0.24%。

2.8 样品的含量测定

取丙氨酸-谷氨酰胺注射液 0.1 mL (标示量为 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 用 1% 磺基水杨酸溶液稀释 10^5 倍后进样, 测得含量为 $(197.8\pm 1.6)\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 为 0.01% ($n=4$)。

2.9 配伍输液的稳定性

丙氨酸-谷氨酰胺注射液是一种高浓度溶液, 在输注前必须与可配伍的氨基酸溶液混合, 1 体积本品至少加 5 体积载体溶液。为了考察丙氨酸-谷氨酰胺在配伍输液中的稳定性, 取 1 mL 丙氨酸-谷氨酰胺注射液, 加入 5 mL 复方氨基酸溶液, 混匀后用 1% 磺基水杨酸稀释 10^4 倍, 分别于 0, 1, 2, 4, 6 h 测定含量。结果丙氨酸-谷氨酰胺含量的 RSD 为 0.51%。

3 讨论

氨基酸分析仪所使用的是磺酸基强酸性阳离子交换树脂, 通过洗淋液的 pH 变化可将氨基酸逐一洗淋下来。分离后的氨基酸与茚三酮反应, 在 570 nm 处有最大吸收。本实验所采用的茚三酮柱后衍生测丙氨酸-谷氨酰胺含量的方法, 操作简便、干扰小、分离度好、可用于丙氨酸-谷氨酰胺的含量测定。

本实验将丙氨酸-谷氨酰胺注射液与复方氨基酸注射液配伍后, 6 h 内外观和含量未见明显变化, 表明丙氨酸-谷氨酰胺与复方氨基酸注射液配伍稳定。

有报道^[3]称丙氨酸-谷氨酰胺 20 g, 加复方氨基酸(18AA-II)500 mL 静脉滴注, 3 d 后发现患者肝损害, 停药后肝功能恢复正常, 再次给药肝功能再次受损。而通过本实验, 可以得出丙氨酸-谷氨酰胺注射液与复方氨基酸配伍后含量稳定, 无配伍禁忌, 出现肝损害的原因应与患者本身的营养状况有关, 临床用药应根据病人的具体情况调整给药方案。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部)[S]. 2010: Appendix 26.
- [2] ZHANG Y C, WANG D D. Determination of *N*(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine in *N*(2)-*L*-alanyl-*L*-glutamine injection by HPLC with pre-column derivatization [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2006, 27(6): 364-366.
- [3] ZHOU X, LIU R N, LI H J. Liver damage following an intravenous infusion of alanyl glutamine plus compound amino acid [J]. Adverse Drug React J(药物不良反应杂志), 2009, 11(3): 208-209.

收稿日期: 2010-10-11