

高效液相色谱法-荧光检测器测定复方氨基酸注射液中铝元素含量

阚微娜, 杨宏伟* (辽宁省检验检测认证中心, 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110036)

摘要: 目的 建立复方氨基酸注射液中铝元素的高效液相色谱测定方法。方法 样品经酸水解后, 游离态的铝元素与流动相中的 8-羟基喹啉结合, 形成荧光配合物, 高效液相色谱-荧光检测器进行测定, 采用标准曲线法计算铝元素的含量。结果 铝元素在 5~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 精密度、重复性的 RSD 均 $<3\%$, 加样回收率在 93.15%~110.07%。结论 方法易操作, 灵敏度高, 准确度高, 为注射液中铝元素的含量测定提供有效的方法。

关键词: 复方氨基酸注射液; 铝元素; 高效液相色谱法; 荧光检测器; 8-羟基喹啉

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)21-2633-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.21.012

引用本文: 阚微娜, 杨宏伟. 高效液相色谱法-荧光检测器测定复方氨基酸注射液中铝元素含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2633-2636.

Determination of Aluminum in Compound Aminoacid Injection by HPLC-Fluorescence Detector

KAN Weina, YANG Hongwei* (Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110036, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for the determination of aluminum in compound aminoacid injections. **METHODS** After acid hydrolysis, the free aluminum was combined with 8-hydroxyquinoline in the mobile phase to form a fluorescent complex. HPLC and fluorescent detector was used to determine the content of aluminum by standard curve method. **RESULTS** The linear relationship of aluminum was good in the range of 5~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The precision and repeatability of RSD were $<3\%$, and the recovery rates were 93.15%~110.07%. **CONCLUSION** The method is easy to operate, high sensitivity and good accuracy. It provides an effective method for the determination of aluminum in the injection.

KEYWORDS: compound aminoacid injection; aluminum; HPLC; fluorescent detector; 8-hydroxyquinoline

铝是地壳中含量最多的金属元素, 研究表明, 铝在人体内蓄积会增加神经系统疾病和骨骼疾病的患病风险^[1]。复方氨基酸注射液作为经静脉途径给药的肠外营养液, 其可能存在的杂质铝元素, 会直接进入血液, 对人体, 尤其对于肾功能不全者和婴幼儿, 造成更大的伤害^[2]。世界卫生组织和联合国粮农组织(WHO/FAO)已于 1989 年正式将铝确定为食品污染物加以控制, 注射用果糖二磷酸钠进口注册标准中对铝含量的限度是 250 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。美国药典(USP41)和日本药局方(JP18)均对肠外营养制剂中的铝含量进行限度控制, 限度为 $\leq 25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[3-5]。近年来, 肠外营养液中微量铝元素的污染与中毒也逐渐受到关注^[6], 但相关方法研究较少。

铝的测定方法很多, 比色法、荧光法、原子吸收光谱、电感耦合等离子体原子发射光谱法及电感耦合等离子体质谱法等^[7]。复方氨基酸注射液成分较为复杂, 铝元素的形态也较为多样化,

比色法灵敏度低, 电感耦合等离子体原子发射光谱法和电感耦合等离子体质谱法仪器价格昂贵, 不利于实验室推广使用。铝元素本身不会发出荧光, 但游离铝可与某些有机试剂生成荧光配合物^[8]。本研究以 8-羟基喹啉作为荧光剂, 建立了高效液相色谱荧光检测器法测定复方氨基酸注射液中铝元素的方法, 为生产企业产品质量控制及提升提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

20A 型高效液相色谱仪、RF-20A 型荧光检测器均来自日本岛津; 超纯水机(密理博)。

金属铝单元素标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心, 批号: 14B011-2; 浓度: 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 8-羟基喹啉(批号: 037M4136V)、醋酸铵(批号: SLBD0692V)均购自 Sigma 公司; 50%氢氧化钠溶液、盐酸(痕量金属级)、高纯硝酸均购自 Fisher 公司; 乙腈(美国天地公司, 色谱纯)。

作者简介: 阚微娜, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (024)31266322
Tel: (024)31266321 E-mail: yjsyw@126.com

E-mail: kanweina@126.com *通信作者: 杨宏伟, 女, 主任药师

以中国药典 2015 年版二部收载的复方氨基酸注射液(18AA, 规格: 250 mL)和复方氨基酸注射液(18AA-I, 规格: 250 mL)为考察样品, 样品均由生产企业提供。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 流动相: 8-羟基喹啉乙腈溶液(3 g→1 000 mL)-0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵(45 : 55)(临用现配); 荧光检测器: 激发波长 380 nm; 发射波长 520 nm; 色谱柱: 资生堂 CAPCELL PAK Phenyl (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 100 μL。标准曲线的相关系数≥0.99。

1.2.2 标准曲线系列溶液配制 精密量取铝元素标准溶液 0.5 mL, 加水稀释至 50 mL, 精密量取 1 mL, 加水稀释至 10 mL, 分别精密量取 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 mL 加水稀释配制成含铝元素 200, 100, 50, 25, 10, 5 μg·L⁻¹ 的溶液。

1.2.3 测定法 精密量取水、标准曲线系列溶液和样品 4.5 mL, 加入盐酸 0.5 mL, 混匀, 50 ℃水浴水解 30 min, 放至室温。精密量取各水解液 0.1 mL, 精密加入衍生试剂(流动相 30 mL, 加入 50% NaOH 180 μL)0.9 mL, 混匀。按“1.2.1”项下方法进样, 测定。以水及标准曲线系列溶液的浓度与其相对应的响应值绘制标准曲线, 并计算线性回归方程, 从线性回归方法计算供试品溶液中铝的浓度, 即得。空白溶液、铝标准溶液及样品溶液的色谱图见图 1。

2 结果与分析

2.1 流动相优化

对流动相中 8-羟基喹啉的浓度进行了筛选, 考察了 0.03, 0.3, 3, 30 mg·mL⁻¹ 的 8-羟基喹啉乙腈溶液, 在保证最终荧光配合物的荧光强度, 以及荧光剂足量过量的前提下, 确保溶液浓度中固体浓度不足以析出晶体, 导致管路堵塞, 最终选择 3 mg·mL⁻¹ 8-羟基喹啉乙腈溶液作为流动相的组成部分。

2.2 测定方法的选择

取复方氨基酸注射液(18AA), 精密加入一定浓度的铝元素标准溶液, 使样品中铝元素的加入量为 100 μg·L⁻¹。对该样品直接按“1.2.1”项下色谱条件测定, 或使用微波消解、酸水解等方法对样品进行预处理, 后再按“1.2.1”项下色谱条件测定, 过程和结果见表 1。结果表明, 加入的铝元素与复方氨基酸注射液中氨基酸络合后, 无法与荧光剂 8-羟基喹啉结合生成荧光配合物, 测定结果与空白溶液相同。微波消解法使用硝酸, 高纯硝酸本身含有 20 μg·L⁻¹ 左右的铝元素, 硝酸使用量较大, 本底浓度过高, 对于微量铝元素的测定存在很大干扰。采用盐酸水解的方法, 可以使络合到氨基酸上的铝元素水解成游离铝, 然后与荧光剂 8-羟基喹啉结合生成荧光配合物。通过筛选, 本研究选择盐酸水解, 再用碱性流动相将水解液中和后测定的方法, 同时空白及标准曲线系列溶液也采用相同的预处理方法, 以减小测定误差。

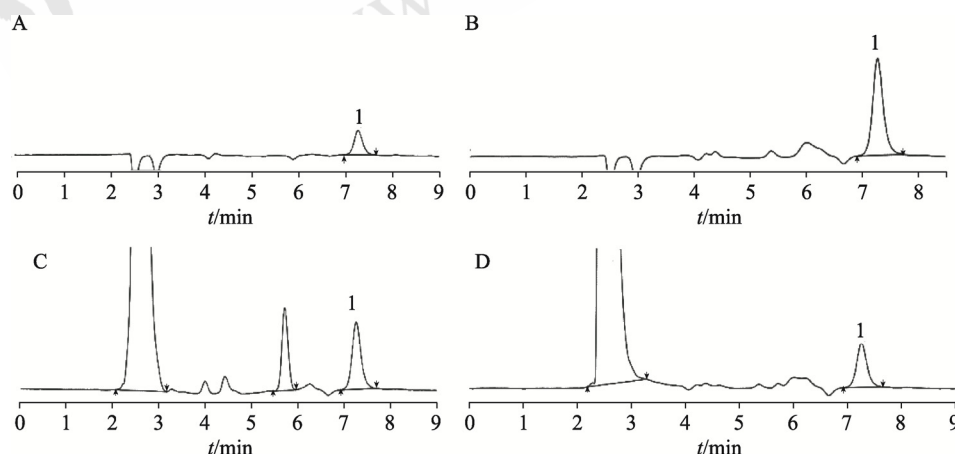


图 1 高效液相色谱图

A-空白溶液; B-铝标准溶液; C-复方氨基酸注射液 18AA 样品溶液; D-复方氨基酸注射液 18AA-I 样品溶液; 1-铝荧光配合物。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank solution; B-aluminum standard solution; C-18AA compound aminoacid injection sample solution; D-18AA-I compound aminoacid injection sample solution; 1-aluminum fluorescent complex.

表1 不同测定方法对测定结果的影响

Tab. 1 Effect of different determination methods on determination results

方法	溶剂	水解温度	t	回收率/%
直接测定	/	/	/	0
微波消解	硝酸	程序升温		300
酸水解	盐酸-水(1:1)	50 °C	30 min	95.8
(样品 4.5 mL+ 溶剂 0.5 mL)	盐酸	50 °C	30 min	101.4
	硝酸-水(1:1)	50 °C	30 min	59.5

2.3 线性关系和进样精密度试验

以标准曲线系列溶液的浓度与其相对应的响应值绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y=1\,452X+18\,184$, 相关系数为 0.999 8, 结果表明, 铝元素在 $5\sim 200\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。

取浓度为 $50\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铝标准溶液,连续进样6次, RSD 为 0.62%, 方法进样精密度结果良好。

2.4 重复性和加样回收率试验

复方氨基酸注射液处方较多,在氨基酸种类、处方量、金属元素、糖以及抗氧化剂等方面存在一定差别。本研究根据样品收集的情况,选取已被中国药典收载的 2 个有代表性的处方复方氨基酸注射液 18AA(12%)和复方氨基酸注射液 18AA- I 的样品作为样本,进行重复性试验,并采用加样回收方式,进行加样回收率试验。

2.4.1 重复性试验 取复方氨基酸注射液 18AA (12%, B 企业,批号: 170301B23)样品 6 份,按“1.2.3”项下测定法和“1.2.1”项下色谱条件测定,铝元素含量为 $31.2\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 为 2.2%。

取复方氨基酸注射液 18AA- I (J 企业,批号: 80LI041)样品 6 份,按“1.2.3”项下测定法和“1.2.1”项下色谱条件测定,铝元素含量为 $15.0\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 为 2.6%。表明方法重复性良好。

2.4.2 加样回收率试验 精密量取复方氨基酸注射液 18AA(12%, B 企业,批号: 170301B23)5 mL,共 9 份,分别精密加入 $100\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝元素标准溶液 0.5, 1.5, 2.5 mL,再分别精密加入水 4.5, 3.5, 2.5 mL,混匀。每个浓度各配制 3 份,即得复方氨基酸注射液 18AA(12%)加样回收率试验溶液。

精密量取复方氨基酸注射液 18AA- I (J 企业,批号: 80LI041)7 mL,共 9 份,分别精密加入 $100\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 铝元素标准溶液 1, 2, 3 mL,再分别精密加入水 2, 1, 0 mL,混匀。每个浓度各配制 3 份。即得复方氨基酸注射液 18AA-I 加样回收率

试验溶液。

按“1.2.3”项下测定法测定,并按“(测得量-本底值)/加入量 $\times 100\%$ ”计算加样回收率,结果见表 2~3。方法准确度良好。

表2 复方氨基酸注射液 18AA 加样回收率试验结果

Tab. 2 Recoveries result of compound aminoacid injection 18AA

序号	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	本底量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
1	20.789		5	103.78		
2	20.835	15.60	5	104.70	104.1	0.6
3	20.790		5	103.80		
4	30.812		15	101.41		
5	29.572	15.60	15	93.15	98.8	5.0
6	30.889		15	101.93		
7	40.016		25	97.67		
8	41.096	15.60	25	101.98	99.2	2.4
9	40.125		25	98.10		

表3 复方氨基酸注射液 18AA- I 加样回收率试验结果

Tab. 3 Recoveries result of compound aminoacid injection 18AA-I

序号	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	本底量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
1	21.507		10	110.07		
2	21.012	10.50	10	105.12	107.4	2.4
3	21.186		10	106.86		
4	31.834		20	106.67		
5	30.548	10.50	20	100.24	104.4	3.5
6	31.776		20	106.38		
7	41.194		30	103.98		
8	42.294	10.50	30	105.98	105.2	1.0
9	42.168		30	105.56		

2.5 样品测定

取 10 个生产企业生产的 16 批次复方氨基酸注射液 18AA 和 3 个生产企业生产的 5 批次复方氨基酸注射液 18AA-I, 分别按“1.2.3”项下测定法测定样品中铝元素的含量,结果见表 4。

3 讨论

美国药典 41 版“用于全肠外营养治疗的大体积肠外制剂、小体积肠外制剂和药房大包装制剂中的铝”的限度为 $25\,\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 按此限度规定,此次考察样品不合格率为 28.6%。可见,国内复方氨基酸注射液的产品质量亟待控制,包材对产品质量的影响十分显著。

表4 样品中铝元素含量测定结果

Tab. 4 Determination results of aluminum in the samples

样品名称	生产企业	批号	铝元素含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
复方氨基酸注射液 18AA	A	16102912	17.28
		16110312	31.22
	B	170228B23	13.71
		170301B21	30.87
		170301B22	31.33
		170301B23	30.18
	C	K16122501	34.83
		K16122601	20.05
	D	1A16111904	19.55
	E	2117031606	7.06
		2117033001	8.07
	F	21701152	13.87
	G	NTA0047EU	19.86
	H	1704100512	19.91
复方氨基酸注射液 18AA-I	I	17040007	15.15
	J	80LL008	4.82
	E	2117040501	13.98
		2117042102	22.26
	H	1704156311	119.80
	J	80LI041	8.92
		80LF057	14.00

本法参考日本药局方建立,但日本药局方中的方法对流动相的浓度、样品的前处理方法均无明确规定,由于铝元素会先与氨基酸结合,无法再与荧光剂生成荧光配合物,因此原方法并不适宜对复方氨基酸注射液中的铝元素进行测定。试验通过对流动相中 8-羟基喹啉浓度的筛选,确定了适宜的流动相浓度;通过对样品前处理的摸索,将复方氨基酸注射液中的络合铝水解成可与荧光剂结合的游离铝,水解后的溶液与预先调节成碱性的流动相中和,并与荧光剂 8-羟基喹啉络合,

生成荧光配合物,为复方氨基酸注射液中铝含量测定提供了新的途径。

8-羟基喹啉与游离铝反应极其灵敏。试验中所用试剂试药、试验用水及环境中都会有微量的铝存在,空白溶液中也有铝与 8-羟基喹啉络合产生的荧光配合物的色谱峰出现,且信噪比远远>10(见图 1A),无法按信噪比的方法规定方法的定量限与检出限。平行测定 6 个不同批号的空白样品(处方中去除氨基酸),铝元素峰面积占标准曲线最低浓度点 $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 峰面积的百分比为 24%,因此对测定有影响。为了减少试验的误差,流动相和衍生试剂均应临用新制,配制溶液的试验用水应与空白一致,尽可能减少溶液与环境的接触,确保空白溶液色谱峰的响应值低于铝标准溶液 $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 色谱峰的响应值。

REFERENCES

- [1] 陈建军, 杨双喜, 杨庆荣, 等. 铝对人类健康的影响及相关食品安全问题研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1326-1329.
- [2] HAN F C, WANG X L, GAO G H. Determination of aluminum in amino acid compound injections(18) by GFAAS [J]. Prac Pharm Clin Rem, 2010, 13(5): 346-347.
- [3] USP 41-NF36 [S]. 2018: 5947.
- [4] JP XVII [S]. 2018: 2414-2415.
- [5] XUE Q R, CHEN Y K, HUANG L H. Determination of Al in fructose sodium diphosphate for injection by atomic absorption spectrometry [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 972-974.
- [6] GAN Z Y, MA F, LI J P. Potential source of aluminum in compound amino acid injection [J]. Herald Med, 2018, 37(7): 865-868.
- [7] 杨忠东, 郭伟明, 沈维, 等. 检测人血白蛋白制品中微量铝荧光分析法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(5): 316-317.
- [8] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2006

收稿日期: 2019-12-19

(本文责编: 沈倩)