

## HPLC 法测定复方氨基酸注射液（20AA）中焦谷氨酸和醋酸根

苏喆, 马冰, 黄哲甦

天津市药品检验研究院, 天津 300070

**摘要:** 目的 建立同时测定复方氨基酸注射液(20AA)中焦谷氨酸、醋酸根的 HPLC 方法。方法 采用 GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-5 mmol/L 磷酸溶液(磷酸调 pH 2.5), 采用梯度洗脱; 检测波长: 210 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 15 μL。结果 在上述色谱条件下, 焦谷氨酸、醋酸根峰与各自相邻峰的分度均大于 2.0; 焦谷氨酸和醋酸根的定量限分别为 0.10、0.99 μg/mL, 检测限分别为 0.03、0.30 μg/mL; 焦谷氨酸和醋酸根分别在 0.1~120.0 μg/mL、0.6~540.0 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。焦谷氨酸和醋酸根的回收率分别为 100.04%、98.39%, RSD 值分别为 0.12%、0.70%。结论 本方法简便、灵敏度高、重现性好, 适用于复方氨基酸类制剂中焦谷氨酸和醋酸根的同时检测。

**关键词:** 复方氨基酸注射液(20AA); 焦谷氨酸; 醋酸根; 高效液相色谱

**中图分类号:** R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)06-1076-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.06.004

## Determination of pyroglutamic acid and acetate ion in Compound Amino Acid Injection (20AA) by HPLC

SU Zhe, MA Bing, HUANG Zhe-su

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of pyroglutamic acid and acetate ion in Compound Amino Acid Injection (20AA). **Methods** GL Sciences Inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile and 5 mmol/L phosphoric acid solution (pH 2.5). The determination was performed by gradient elution. The detection wavelength was set at 210 nm. The flow rate was 1.0 mL/min; the volume of injection was 15 μL, and the temperature of column was set at 25 °C. **Results** The resolutions of pyroglutamic acid and acetate ion with their own closely eluting peaks were both good with  $R > 2.0$ . The LOQs of pyroglutamic acid and acetate ion were 0.10 and 0.99 μg/mL, respectively. The LODs were 0.03 and 0.30 μg/mL, respectively. Pyroglutamic acid and acetate ion had good linearity in the range of 0.1 — 120.0 μg/mL and 0.6 — 540.0 μg/mL, respectively. The average recoveries were 100.04% and 98.39%, with RSD values of 0.12% and 0.70%, respectively. **Conclusion** The method is simple and convenient, and has high sensitivity and good reproducibility, and is suitable for the simultaneous determination of pyroglutamic acid and acetate ion in compound amino acid prescriptions.

**Key words:** Compound Amino Acid Injection (20AA); pyroglutamic acid; acetate ion; HPLC

复方氨基酸注射液(20AA)是由20种L-氨基酸配制而成的无菌复方制剂,临床上作为全肠外营养系统的一部分用于预防和治疗肝性脑病,可满足肝功能衰竭状态下的特殊代谢需要,并用于肝病或肝性脑病急性期的静脉营养以及其他原因引起的营养不良的肠道外营养治疗。复方氨基酸注射液(20AA)中氨基酸总量占比为10%,富含精氨酸、

门冬氨酸、谷氨酸、鸟氨酸等多种降氨组分,可以纠正氨中毒,在供给充分营养的同时有效预防各种肝性脑病。其中谷氨酸含量高达5.70 mg/mL。谷氨酸在高温灭菌和储存过程中易发生脱水缩合反应,降解形成焦谷氨酸<sup>[1]</sup>。焦谷氨酸在体内能够结合谷氨酸受体,抑制谷氨酸的摄取,对人体中枢神经系统产生不良影响<sup>[2]</sup>。焦谷氨酸还会导致机体产生阴

收稿日期: 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31970667); 重大新药创制国家科技重大专项(2019ZX09721001-006-001); 国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2019H03); 天津市“131”创新型人才培养工程项目

作者简介: 苏喆(1985—),女,山西人,博士,助理研究员,研究方向为生化药物与生物制品的分析及质量控制。E-mail: marilyn66@163.com

离子间隙增高的代谢性酸中毒<sup>[3]</sup>。复方氨基酸注射液(20AA)中醋酸根主要来源于原料醋酸赖氨酸,同时调节剂 pH 值也可能引入醋酸根。醋酸根含量的高低会影响终产品的 pH 值,而 pH 值对产品的稳定性起着至关重要的作用。研究表明,谷氨酸的稳定性与温度、pH 值的变化直接相关,在 pH 值小于侧链的 pKa 值(pKa=4.25)时,谷氨酸的稳定性降低,更易降解产生焦谷氨酸<sup>[4]</sup>。因此,醋酸根的含量与焦谷氨酸的形成也存在潜在的相关性。关于焦谷氨酸的 HPLC 分析方法多集中于味精、咖啡、血浆以及人角质层等样本的测定<sup>[5-8]</sup>。醋酸根的检测方法主要包括气相色谱法、HPLC 法、离子色谱法、滴定法等<sup>[9-12]</sup>。为了进一步提高产品的分析检测效率,本研究采用 HPLC 法同时测定复方氨基酸注射液(20AA)中焦谷氨酸和醋酸根,为复方氨基酸类制剂质量标准的提高和完善提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪, Waters 2489 UV/VIS 检测器, Empower 3.0 色谱工作站; Mettler Toledo XS205 型十万分之一电子天平。

焦谷氨酸(批号 140763-201602, 质量分数 100.0%)、无水醋酸钠(批号 100735-201502, 质量分数 100.0%)、异亮氨酸(批号 140683-201302, 质量分数 99.9%)、酪氨酸(批号 140609-201513, 质量分数 99.8%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 复方氨基酸注射液由德国贝朗医疗股份公司提供, 规格 500 mL : 50 g, 批号 180248061、181548062、181548063; 乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯; 实验用水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 5 mmol/L 磷酸溶液(磷酸调 pH 2.5), 流动相 B: 乙腈-流动相 A(80 : 20), 采用梯度洗脱(0~15 min, 0% B; 15~20 min, 0%→100% B; 20~24 min, 100% B; 24~25 min, 100%→0% B; 25~40 min, 0% B); 检测波长: 210 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 15 μL。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 供试品溶液的制备** 精密量取复方氨基酸注射液(20AA) 3 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用 5 mmol/L 磷酸溶液(磷酸调 pH 2.5) 稀释并加至刻度, 摇匀,

即得。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别取无水醋酸钠、焦谷氨酸对照品各适量, 精密称定, 加 5 mmol/L 磷酸溶液(磷酸调 pH 2.5) 溶解, 并稀释制成约含醋酸钠 525 μg/mL、焦谷氨酸 100 μg/mL 的对照品溶液, 即得。

**2.2.3 阴性样品溶液的制备** 按处方量精密称取原辅料(除醋酸赖氨酸、谷氨酸外), 配制成与供试品溶液相同质量浓度的溶液, 作为阴性样品溶液。

**2.2.4 系统适应性溶液的制备** 分别取无水醋酸钠、焦谷氨酸、异亮氨酸和酪氨酸对照品各适量, 用 5 mmol/L 磷酸溶液(磷酸调 pH 2.5) 溶解并稀释制成约含醋酸钠 525 μg/mL、焦谷氨酸 100 μg/mL、异亮氨酸 600 μg/mL、酪氨酸 25 μg/mL 的混合溶液, 作为系统适用性溶液。

### 2.3 系统适应性试验

取系统适用性溶液, 进样测定, 记录色谱图, 结果见图 1。醋酸根与异亮氨酸、焦谷氨酸与酪氨酸的分离度均大于 2.0, 符合要求。焦谷氨酸、醋酸根的理论板数分别为 13 669、13 448。连续进样 6 次, 焦谷氨酸和醋酸根峰峰面积、出峰时间的 RSD 值均小于 2.0%。

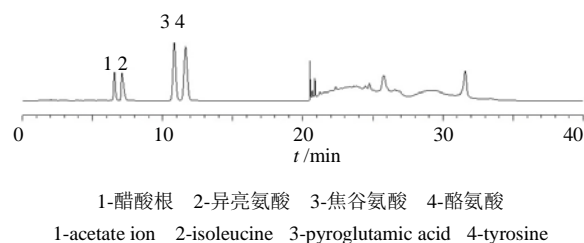


图 1 系统适用性试验色谱图

Fig. 1 Chromatogram of system suitability test

### 2.4 专属性试验

精密量取对照品溶液、供试品溶液(批号 180248061)、阴性样品溶液各 15 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 2。结果阴性样品溶液在与焦谷氨酸、醋酸根对照品相同保留时间处无色谱峰出现, 表明阴性样品对检测无干扰。

### 2.5 定量限与检测限考察

精密量取焦谷氨酸、醋酸根对照品溶液适量, 逐级稀释, 进样测定, 记录信噪比(S/N)为 10、3 的色谱峰, 分别计算定量限、检测限的限值。结果焦谷氨酸、醋酸根的定量限分别为 0.10、0.99 μg/mL, 检测限分别为 0.03、0.30 μg/mL。

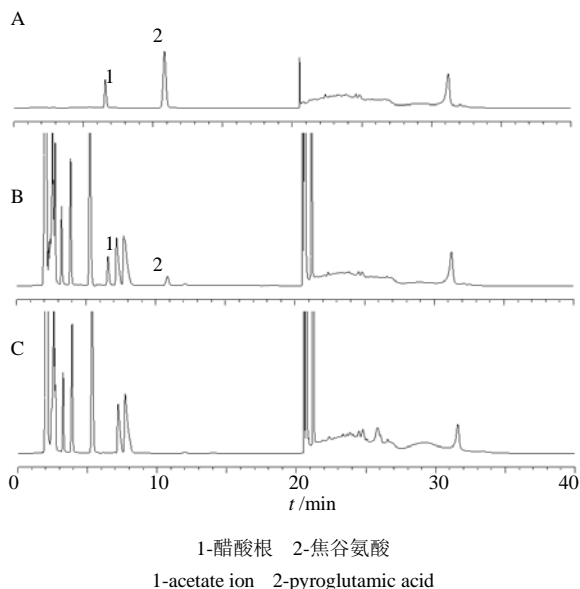


图 2 对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of reference substance (A), test sample (B), and negative sample (C)

## 2.6 线性关系考察

精密称取焦谷氨酸对照品适量, 用 5 mmol/L 磷酸溶液 (磷酸调 pH 2.5) 溶解并稀释成分别含焦谷氨酸 0.1、1.0、10.0、30.0、50.0、80.0、100.0、120.0  $\mu\text{g/mL}$  的溶液, 作为焦谷氨酸对照品线性系列溶液。精密称取无水醋酸钠对照品适量, 用 5 mmol/L 磷酸溶液 (磷酸调 pH 2.5) 溶解并稀释成分别含醋酸钠 0.6、36.0、72.0、144.0、288.0、360.0、432.0、540.0  $\mu\text{g/mL}$  的溶液, 作为醋酸根对照品线性系列溶液。分别进样测定, 记录色谱图。以质量浓度为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 进行线性回归。焦谷氨酸回归方程  $Y=5615 X+1451.3$ ,  $r=1.0000$ ; 醋酸根回归方程  $Y=29291 X-324.2$ ,  $r=1.0000$ 。结果焦谷氨酸、醋酸根分别在 0.1~120.0  $\mu\text{g/mL}$ 、0.6~540.0  $\mu\text{g/mL}$  与峰面积呈良好线性关系。

## 2.7 精密度试验

精密量取对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录所测成分焦谷氨酸、醋酸根的峰面积, 结果焦谷氨酸、醋酸根峰面积的 RSD 值分别为 0.08%、0.03%。

## 2.8 重复性试验

取批号 180248061 复方氨基酸注射液 (20AA) 样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定。结果所测焦谷氨酸、醋酸根质量浓度的 RSD 值分别为 0.47%、0.39%。

## 2.9 稳定性试验

取批号 180248061 复方氨基酸注射液 (20AA) 样品, 制备供试品溶液, 在室温下放置 0、2、4、8、12、16、20、24 h 后进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液中焦谷氨酸、醋酸根峰面积的 RSD 值分别为 0.38%、1.08%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

## 2.10 回收率试验

取批号 180248061 复方氨基酸注射液 (20AA) 样品 1.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 平行制备 9 份, 分别精密加入另行配制的混合对照品溶液 (焦谷氨酸 0.2 mg/mL、醋酸根 6 mg/mL) 0.8、1.0、1.2 mL, 用 5 mmol/L 磷酸溶液 (磷酸调 pH 2.5) 加至刻度, 混匀。每个质量浓度平行 3 份, 进样测定。结果焦谷氨酸、醋酸根平均回收率分别为 100.04%、98.39%, RSD 值分别为 0.12%、0.70%。

## 2.11 样品测定

取批号 180248061、181548062、181548063 复方氨基酸注射液 (20AA) 样品, 制备供试品溶液, 依法进样, 按外标法以峰面积计算焦谷氨酸和醋酸根, 结果见表 1。

表 1 复方氨基酸注射液 (20AA) 中焦谷氨酸、醋酸根的测定结果 ( $n=3$ )

Table 1 Determination of pyroglutamic acid and acetate ion in Compound Amino Acid Injection(20AA) ( $n=3$ )

批号	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	
	焦谷氨酸	醋酸根
180248061	0.143	3.120
181548062	0.142	3.096
181548063	0.139	3.102

## 3 讨论

### 3.1 流动相的优化与考察

实验对乙腈 - 5 mmol/L 磷酸溶液、甲醇 - 5 mmol/L 磷酸溶液、乙腈 - 10 mmol/L 磷酸氢二铵溶液<sup>[13-14]</sup>、乙腈 - 辛酸磺酸钠溶液<sup>[7]</sup>分别作为流动相体系进行试验, 结果显示乙腈 - 5 mmol/L 磷酸溶液系统下各相邻组分分离度较佳, 并考察采用磷酸分别调节 pH 2.0、2.5、3.0, 结果发现磷酸调节 pH 2.5 条件下基线平稳, 各色谱峰理论塔板数和拖尾因子均为最佳。

### 3.2 耐用性试验

考察色谱柱种类、柱温、体积流量以及流动相

磷酸溶液的比例变化对焦谷氨酸、醋酸根测定的影响。比较了 GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Agilent ZOR BAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对焦谷氨酸、醋酸根检测的影响, 结果表明两种色谱柱分离成分的色谱行为差异不大, 均符合系统适用性要求, 均可用于复方氨基酸注射液 (20AA) 中焦谷氨酸、醋酸根的检测。柱温、体积流量以及流动相磷酸溶液的比例发生微小变动对焦谷氨酸和醋酸根的测定无影响, 方法耐用性良好。

复方氨基酸注射液 (20AA) 成分较多, 包含 20 种氨基酸、乙二胺四醋酸二钠等辅料, 基质非常复杂, 因此其他组分易干扰焦谷氨酸、醋酸根的测定。在本实验色谱系统下, 焦谷氨酸与酪氨酸、醋酸根与异亮氨酸出峰时间非常接近。因此, 通过考察流动相体系、色谱柱的适用性来实现上述相邻峰的分离是本实验的关键技术难点。焦谷氨酸是复方氨基酸注射液 (20AA) 高温灭菌工艺过程中产生的重要杂质, 而醋酸根则会影响终产品的 pH 值, 均需要严格控制。本实验建立了同时测定复方氨基酸注射液中两种重要组分的方法, 大大缩短分析周期, 提高检测效率, 且具有普适性, 适用于检测同时含谷氨酸、醋酸盐的复方氨基酸类产品。本实验采用梯度洗脱法, 准确度高, 操作简便, 所测两个组分与其他成分 (酪氨酸、异亮氨酸) 分离效果佳, 耐用性强, 可以为复方氨基酸注射液 (20AA) 的质量控制、标准提高提供参考。

#### 参考文献

- [1] Unger N, Holzgrabe U. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147: 125-139.
- [2] Kumar A, Bachhawat A K. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite [J]. *Curr Sci*, 2012, 102(2): 288-297.
- [3] Fenves A Z, Kirkpatrick H M, Patel V V, *et al.* Increased anion gap metabolic acidosis as a result of 5-oxoproline (pyroglutamic acid): a role for acetaminophen [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(3): 441-447.
- [4] Kato M, Yamazaki T, Kato H, *et al.* Effects of the pH and concentration on the stability of standard solutions of proteinogenic amino acid mixtures [J]. *Anal Sci*, 2017, 33(11): 1241-1245.
- [5] 潘馨, 冯旭东, 刘明明. 味精中焦谷氨酸检测方法的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(2): 372-378.
- [6] Galli V, Barbas C. Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1032(1-2): 299-304.
- [7] 徐桂连, 蓝晓艳, 庄子瑜, 等. HPLC 法测定人血浆中焦谷氨酸的含量 [J]. *中国药物评价*, 2018, 35(4): 264-266.
- [8] Joo K M, Han J Y, Son E D, *et al.* Rapid, simultaneous and nanomolar determination of pyroglutamic acid and cis-/trans-urocanic acid in human stratum corneum by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 897: 55-63.
- [9] Scortichini S, Boarelli M C, Silvi S, *et al.* Development and validation of a GC-FID method for the analysis of short chain fatty acids in rat and human faeces and in fermentation fluids [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1143: 121972.
- [10] Xie R, Tu M, Wu Y, *et al.* Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(7): 4938-4942.
- [11] 白海娇. 离子色谱法测定复方氨基酸注射液 (20AA) 中醋酸根 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(5): 494-496.
- [12] 韩璐. 半微量滴定分析实验的可行性研究 [J]. *化工时刊*, 2017, 31(3): 25-27.
- [13] 谢升谷, 胡楚楚, 黄巧巧, 等. HPLC 法测定复方氨基酸注射液 (18AA) 中焦谷氨酸的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(4): 705-709.
- [14] Li L, Qin Y R, Ma B Y, *et al.* Direct and simultaneous determination of methionine sulfoxide and pyroglutamic acid impurities in Compound Amino Acid Injection-18 AA by ion-pair reversed-phase HPLC [J]. *Sep Sci Plus*, 2018, 59: 1-7.