

离子色谱法测定小儿复方氨基酸注射液中的氨含量

傅萍, 刘峰, 谢华(四川省食品药品检验检测院, 成都 611731)

摘要: 目的 采用离子色谱法优化测定小儿复方氨基酸注射液中的氨含量。方法 采用阳离子交换色谱柱 RFICTM IonPac® CG16(4 mm×50 mm), 保护柱 CS16(4 mm×250 mm); 以 20 mmol·L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 A, 以 100 mmol·L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测器为电导检测器(带抑制器 CERS 300, 4 mm); 进样体积 25 μL。结果 氨的线性范围为 0.149 9~5.997 9 μg·mL⁻¹($r=0.998\ 4$), 平均回收率为 96.8%, RSD 为 2.82%。结论 该法专属性高、结果准确可靠, 可用于小儿复方氨基酸注射液中氨的含量控制。

关键词: 离子色谱法; 阳离子交换柱; 电导检测器; 小儿复方氨基酸注射液; 氨; 含量测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)18-2295-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.18.012

引用本文: 傅萍, 刘峰, 谢华. 离子色谱法测定小儿复方氨基酸注射液中的氨含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(18): 2295-2298.

Determination of Ammonium in Pediatric Compound Aminoacid Injection by Ion Chromatography

FU Ping, LIU Feng, XIE Hua(*Sichuan Food and Drug Inspection and Testing Institute, Chengdu 611731, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To use ion chromatography method to optimize the assay of ammonium in Pediatric Compound Aminoacid injection. **METHODS** The IC method was performed on a cation exchange column RFICTM IonPac® CG16 (4 mm×50 mm), CS16(4 mm×250 mm) by gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The mobile phase A was 20 mmol·L⁻¹ methanesulfonic acid, the mobile phase B was 100 mmol·L⁻¹ methanesulfonic acid. The detector was conductivity detector with a suppressor(CERS 300, 4 mm) and the injection volume was 25 μL. **RESULTS** The linear range of the ammonium was 0.149 9~5.997 9 μg·mL⁻¹($r=0.998\ 4$). The average recovery of it was 96.8% and the RSD was 2.82%. **CONCLUSION** The method was specific, accurate and suitable for the assay of ammonium for quantitative control of Pediatric Compound Aminoacid injection.

KEYWORDS: ion chromatography; cation exchange column; conductivity detector; Pediatric Compound Aminoacid injection; ammonium; content determination

小儿复方氨基酸注射液包含 18AA-I、18AA-II 和 19AA-I 3 个系列品种, 均为静脉用胃肠外营养输液, 用于早产儿、低体质量儿及各种病因所致不能经口摄入蛋白质或摄入量不足的新生儿和因烧伤、外伤及手术等高代谢状态的小儿^[1]; 最近临床上还将其与叶酸片、葡萄糖酸锌或小剂量 654-2 片联合用药, 用于治疗小儿轮状病毒感染性肠炎、迁延性腹泻等疾病^[2-4]。

由于小儿复方氨基酸注射液中, 氨基酸种类繁多, 其中部分氨基酸不稳定, 在一定条件下会发生脱氨作用, 生成氨, 注入人体后会引引起血氨, 对人体产生损伤, 原标准中均未收载该检查项, 因此拟增订该检查项。目前氨测定主要对氨衍生化后采用 UV 测定^[5], 该方法耗时较长, 且专属性较差, 衍生化试剂稳定性差。为了更有效控制小

儿复方氨基酸注射液中氨的含量, 本实验拟建立能直接、准确地测定氨含量的离子色谱法, 为同类产品氨含量的测定提供参考。

1 仪器与试剂

ICS50 离子色谱仪-AS-DV 进样器(美国 Dionex), 检测器: 电导检测器; 工作站: Chromeleon 6.80 SR9a Build 2680 (163077)。RFICTM IonPac® CS16 离子色谱柱(4 mm×250 mm), RFICTM IonPac® CG16 离子色谱保护柱(4 mm×250 mm)。抑制器: Dionex CERS 300(4 mm)。氯化铵对照品(成都市科龙化工试剂厂, 纯度≥99.5%; 批号: 2017020101), 小儿复方氨基酸注射液[18AA-I, 广州利泰制药股份有限公司, 批号: 1117031113 等 11 批; 规格: 100 mL: 6.74 g(总氨基酸)。18AA-I, 天津金耀药业有限公司, 批号: 1707241 等 27 批;

作者简介: 傅萍, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (028)87877147

E-mail: 2234692281@qq.com

规格：20 mL：1.348 g(总氨基酸)。18AA-I，福州海王福药制药有限公司，批号：81803041 等 5 批，规格：250 mL：8.06 g(总氨基酸)与 12.5 g 木糖醇；18AA-I，辰欣药业股份有限公司，批号：1711086321 等 40 批，规格：100 mL：6.74 g(总氨基酸)；18AA-II，上海长征富民金山制药有限公司，批号：A161209 01 等 8 批，规格：50 mL：3.0 g(总氨基酸)；19AA-I，山东齐都药业有限公司，批号：3A17091603 等 15 批，规格：100 mL：6.0 g(总氨基酸)；19AA-I，华润双鹤药业股份有限公司，批号：K1709283 等 29 批，规格：20 mL：1.2 g(总氨基酸)]；水为超纯水(德国赛多利斯 arium pro)，甲基磺酸(色谱纯，CNW)；乙腈(色谱纯，Fisher)；CPA255D 十万分之一天平(德国 Sartorius)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

阳离子交换色谱柱 RFIC™ IonPac® CG16 (4 mm×50 mm)，保护柱 CS16(4 mm×250 mm)。以 20 mmol·L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 A，以 100 mmol·L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 B，梯度洗脱：0~15 min，100%A；15.1~35 min，0%A；35.1~45 min，100%A。流速为 1.0 mL·min⁻¹；检测器为电导检测器(带抑制器 CERS 300，4 mm)。理论板数按氨离子峰计算≥2 000。

2.2 测定方法

精密量取本品 5 mL，置 50 mL 量瓶中，加超纯水稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液；取氯化铵 89 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液(含氨 0.3 mg·mL⁻¹)；精密量取对照品储备溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液(含氨 3.0 μg·mL⁻¹)。精密量取供试品溶液、对照品溶液各 25 μL，分别注入离子色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算。

2.3 系统适用性试验

精密量取空白辅料、氯化铵对照品溶液及供试品溶液各 10 μL 进样，记录色谱图。空白辅料无干扰，对照品溶液、供试品溶液中无其他杂质峰干扰；待测峰理论板数均>3 000，峰形良好。对照品溶液、供试品溶液、空白辅料溶液的色谱图见图 1。

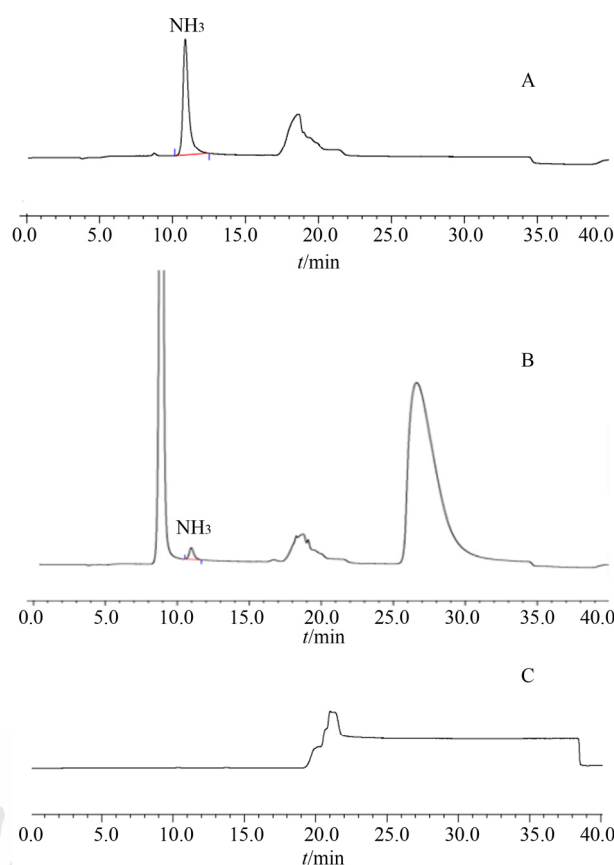


图 1 氨对照品(A)、供试品(B)与空白(C)溶液的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of ammonium control solution(A), sample solution(B) and adjuvant solution(C)

2.4 线性范围

精密量取对照品储备溶液(含氨 0.3 mg·mL⁻¹) 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL，分别置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，得到系列对照品溶液。精密量取上述溶液各 25 μL 分别进样，记录色谱图。以浓度(X)作为横坐标，待测组分峰面积(Y)作为纵坐标，进行线性回归，得到回归方程为 $Y=0.282\ 0X+0.047\ 7$ ($r=0.998\ 4$)。结果表明，氨浓度在 0.149 9~5.997 9 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.5 定量限与检测限

精密量取对照品溶液(含氨 3.0 μg·mL⁻¹)适量，逐级稀释，注入离子色谱仪，记录色谱图。按信噪比(S/N)10:1 确定定量限，按信噪比(S/N)3:1 确定检测限。经换算，氨定量限为 0.009 7 μg·mL⁻¹，检测限为 0.002 9 μg·mL⁻¹。

2.6 回收率试验

精密量取氨离子储备溶液(约 0.3 mg·mL⁻¹) 5 mL，置 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度摇匀，

分别精密量取 0.5, 1, 15 mL, 各 3 份, 置 10 mL 量瓶中, 再分别精密量取供试品(批号: 1707241)1 mL 分别置上述量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率试验 50%, 100%, 150% 的供试液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 1。氨的回收率为 96.8%, RSD 为 2.82%。结果表明, 该方法回收率良好。

表 1 氨回收率的试验结果

Tab. 1 Results of the recovery tests of ammonium

浓度/%	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
50	0.014 99	0.015 02	100.16		
	0.014 99	0.015 13	100.92		
	0.014 99	0.014 93	99.55		
100	0.029 99	0.028 36	94.57		
	0.029 99	0.028 17	93.94	96.8	2.82
	0.029 99	0.028 19	94.01		
150	0.044 98	0.043 10	95.82		
	0.044 98	0.043 35	96.38		
	0.044 98	0.043 08	95.78		

2.7 仪器精密度试验

精密量取对照品溶液 25 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算氨峰面积的 RSD 为 1.2%, 满足 $\text{RSD} \leq 2\%$ 的要求, 说明该法仪器精密度良好。

2.8 稳定性考察

精密量取对照品溶液, 分别于 0, 4, 6, 8, 24 h 进样, 记录色谱图, 计算氨峰面积的 RSD 为 2.14%, 满足 $\text{RSD} \leq 4\%$ 的要求, 说明对照品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 日内和日间精密度

取同一批样品 6 份, 分别按“2.2”项下方法测定氨含量, 计算平均含量为 $4.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 4.0%, 说明该法日内精密度良好。取同一批样品, 分别于 1, 2, 3 d 按照“2.2”项下方法测定氨含量, 计算平均含量为 $4.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 4.6%, 满足 $\text{RSD} \leq 8\%$ 的要求, 说明该法日间精密度良好。

2.10 耐用性

取同一批样品, 微调色谱条件, 测定氨的含量, 结果见表 2。

2.11 样品测定

按“2.2”项下方法, 对 135 批市售样品进行了检验, 结果见表 3。

表 2 耐用性试验结果

Tab. 2 Results of robustness

色谱条件	氨含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
初始条件(流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$)	4.10
流速: $1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$	4.11
流速: $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$	4.11
色谱柱温度: $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	4.10
平均值	4.10
RSD/%	1.4

表 3 小儿复方氨基酸注射液中氨检查结果

Tab. 3 Determination results of ammonium in samples

生产企业	样品数量/批	氨含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%
广州利泰制药股份有限公司	11	4.3~13.5	52.7
天津金耀药业有限公司	27	2.1~3.6	17.8
福州海王福药制药有限公司	5	6.0~6.7	3.9
辰欣药业股份有限公司	40	2.5~5.6	22.2
上海长征富民金山制药有限公司	8	3.2~4.1	9.7
山东齐都药业有限公司	15	2.9~4.1	9.8
华润双鹤药业股份有限公司	29	3.4~6.5	18.0

3 讨论

分别采用离子色谱柱 RFICTM IonPac[®] CS12(4 mm \times 250 mm), 离子色谱(IC)保护柱 RFICTM IonPac[®] CG12(4 mm \times 250 mm)和离子色谱柱 RFICTM IonPac[®] CS17(4 mm \times 250 mm), 离子色谱保护柱 RFICTM IonPac[®] CG17(4 mm \times 250 mm), 采用 5, 10, 15, 20 mmol \cdot L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 A, 50, 100 mmol \cdot L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 B, 调整洗脱比例测定氨, 发现氨与供试品中存在的钠离子及其他阳离子无法基线分离, 影响氨的测定。另更换离子色谱柱 RFICTM IonPac[®] CS16(4 mm \times 250 mm), 离子色谱保护柱 RFICTM IonPac[®] CG16(4 mm \times 250 mm), 采用 20 mmol \cdot L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 A, 100 mmol \cdot L⁻¹ 甲基磺酸为流动相 B, 调整洗脱比例, 使氨与钠离子良好分离, 综上所述, 优选 RFICTM IonPac[®] CS16(4 mm \times 250 mm)作为本品中氨的测定色谱柱。

对市售 135 批样品进行检测, 广州利泰制药股份有限公司生产的 18AA-I 中游离氨测定结果离散程度较大, 提示工艺稳定性差, 且参照与本品总氨基酸量基本相当的长链脂肪乳/氨基酸(16)/葡萄糖(16%)注射液的进口注册标准(JX20110281)中游离氨的限度值 $0.001\%(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$, 即 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

则广州利泰制药股份有限公司的 11 批次样品中有 3 批次超限, 存在潜在风险。

参照中国药典 2015 年版通则指导原则 9001 “原料药物与制剂稳定性试验指导原则”, 按拟定有关物质方法考察了 18AA-I(分别充氮、充空气、充氧)和 18AA-II(分别充氮、充空气、充氧)在避光低温(<20 °C)、高温(60 °C)、强光(4 500 Lx)照射试验条件下于 0, 5, 10 d 中游离氨的变化, 结果见图 2。由图 2 可知, 18AA-I 在充氮条件下, 避光低温、光照和高温均较稳定; 在空气条件下, 避光低温较稳定, 光照和高温游离氨略有增加; 在富氧条件下, 高温游离氨明显增加, 避光低温和光照游离氨略有增加。而 18AA-II 在充氮条件下, 避光低温相对较稳定, 光照游离氨略有增加, 高温游离氨明显增加; 在空气和富氧条件下, 避光低温均较稳定, 光照和高温游离氨均明显增加, 结果见图 3。18AA-I 和 18AA-II 间游离氨变化差异较大, 可能源于处方和处方量的差异。

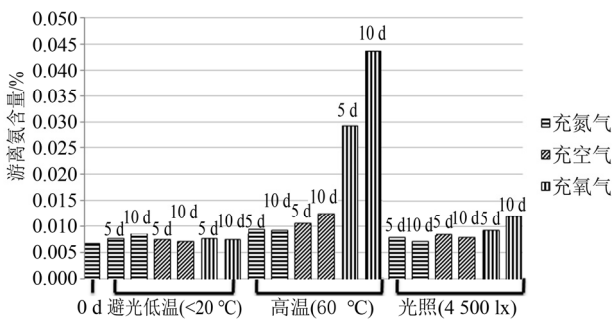


图 2 游离氨变化趋势图(18AA-I 影响因素试验结果)
Fig. 2 Trend chart of the free ammonia(results of influencing factors of 18AA- I)

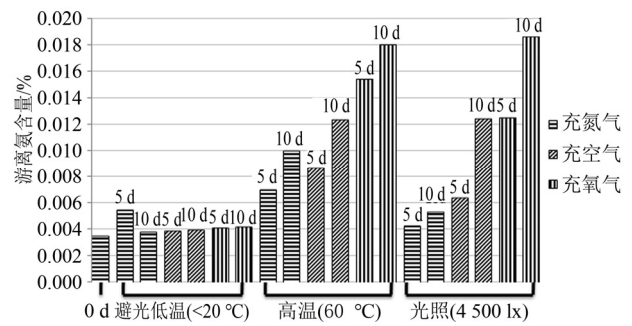


图 3 游离氨变化趋势图(18AA-II 影响因素试验结果)
Fig. 3 Trend chart of the free ammonia(results of influencing factors of 18AA- II)

通过本实验建立的方法, 发现 18AA-I 和 18AA-II 虽对高温、光、氧均较敏感, 但同时存在 2 个条件时(如高温和氧或光照和氧)才显著产生游离氨, 因此建议氨基酸类注射剂品种应充氮、阴凉或低温、遮光保存, 以保证此类产品的整体质量。

REFERENCES

- [1] 李妮. 小儿复方氨基酸的临床应用与护理[J]. 现代医药卫生, 2012, 28(6): 919-920.
- [2] 黎文宏. 叶酸片与复方氨基酸注射液辅助治疗小儿秋季腹泻 50 例疗效观察[J]. 中国伤残医学, 2014, 22(1): 149-150.
- [3] 王义江, 吕文丽, 吕银. 小儿复方氨基酸联合葡萄糖酸锌治疗轮状病毒性肠炎 30 例疗效观察[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(6): 903-904.
- [4] 顾燕, 钟晓萍, 王承芳. 小儿复方氨基酸注射液与小剂量 654-2 联合应用治疗小儿轮状病毒感染性腹泻的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2014, 12(17): 270-271
- [5] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准: 国家药品标准 YBH18092006 [S]. 北京.

收稿日期: 2019-01-08

(本文责编: 曹粤锋)