



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108663448 A

(43)申请公布日 2018.10.16

(21)申请号 201810457668.7

(22)申请日 2018.05.14

(71)申请人 中国医学科学院医药生物技术研究所

地址 100050 北京市东城区天坛西里1号

(72)发明人 山广志 左利民 徐士婕 李盼盼
宗艳平 朱志玲 赵婷 朱明慧
孙伟

(74)专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535

代理人 牛艳玲

(51)Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

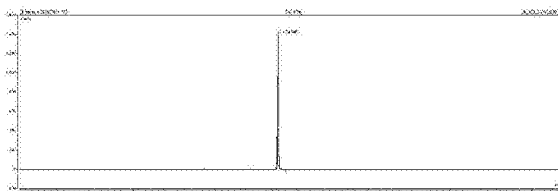
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种复方氨基酸注射液中有物质的检测方法

(57)摘要

本发明提供一种复方氨基酸注射液中有物质的检测方法,该方法以5-羟基色氨酸和L-犬尿氨酸为指针性杂质,通过三氟乙酸-七氟丁酸离子对色谱方法优化了氨基酸注射液中所含有的各种氨基酸和有关物质的分离和基线稳定性,检测灵敏度高,准确性和重现性好,能够满足复方氨基酸注射液中有物质控制的要求。



1. 一种复方氨基酸注射液中有有关物质的检测方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

(1) 供试品溶液和对照品溶液的制备:

取复方氨基酸注射液直接用作供试品溶液;

配制至少3个不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液和至少3个不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液;

(2) 取不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液的色谱图,以5-羟基色氨酸的浓度为横坐标,以该浓度所对应的峰面积为纵坐标,制作标准曲线或回归方程;取不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液注入高效液相色谱仪,记录365nm波长下不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液的色谱图,以L-犬尿氨酸的浓度为横坐标,以该浓度所对应的峰面积为纵坐标,制作标准曲线或回归方程;

(3) 取供试品溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下和365nm波长下供试品溶液的色谱图,按标准曲线法,以供试品溶液280nm波长色谱图中5-羟基色氨酸的峰面积根据标准曲线或回归方程计算供试品溶液中5-羟基色氨酸的量,不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%,以供试品溶液365nm波长色谱图中L-犬尿氨酸的峰面积根据标准曲线或回归方程计算供试品溶液中L-犬尿氨酸的量,不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%;

其中,所述复方氨基酸注射液中含有色氨酸。

优选,所述复方氨基酸注射液为复方氨基酸(15)双肽(2)注射液、复方氨基酸注射液(18AA)(规格包括5%和12%)、复方氨基酸注射液(18AA-I)、复方氨基酸注射液(18AA-II)(规格包括5%、8.5%、11.4%)、复方氨基酸注射液(18AA-III)、复方氨基酸注射液(18AA-V)、复方氨基酸注射液(18AA-VII)、复方氨基酸注射液(20AA)、复方氨基酸注射液(15AA)、复方氨基酸注射液(14AA)、复方氨基酸注射液(17AA)。

优选,所述复方氨基酸注射液为复方氨基酸(15)双肽(2)注射液。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(1)中,进一步配制含有供试品溶液的对照溶液;在步骤(2)中,进一步取对照溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下对照溶液的色谱图;在步骤(3)中,按自身对照法,供试品溶液280nm波长色谱图中若检出其他色谱峰,单个峰面积通过与对照溶液中色氨酸峰面积相比,含量不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.5%,总峰面积通过与对照溶液中色氨酸峰面积相比,含量不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的5%。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,配制对照品溶液的溶剂为稀盐酸水溶液,更优选浓度为0.1mol/L的盐酸水溶液。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其特征在于,对照溶液的溶剂为稀盐酸水溶液,更优选浓度为0.1mol/L的盐酸水溶液。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,配制3-7个,进一步优选3-5个,更优选3个不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液。

优选,用于制作标准曲线或回归方程的多个对照品溶液中5-羟基色氨酸的最小浓度应低于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.1%,最大浓度应高于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.4%。

优选,复方氨基酸注射液为复方氨基酸(15)双肽(2)注射液,其色氨酸标示量为0.95g/500ml,用于制作标准曲线或回归方程的3个对照品溶液中5-羟基色氨酸的浓度范围分别是0.2-0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6-2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选,3个对照品溶液中5-羟基色氨酸的浓度分别是约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其特征在于,配制3-7个,进一步优选3-5个,更优选3个不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液。

优选,用于制作标准曲线或回归方程的多个对照品溶液中L-犬尿氨酸的最小浓度应低于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.1%,最大浓度应高于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.4%。

优选,复方氨基酸注射液为复方氨基酸(15)双肽(2)注射液,其色氨酸标示量为0.95g/500ml,用于制作标准曲线或回归方程的3个对照品溶液中L-犬尿氨酸的浓度范围分别是0.2-0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6-2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、8-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,更优选,3个对照品溶液中L-犬尿氨酸的浓度分别是约0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、约9.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其特征在于,对照溶液中供试品溶液占对照溶液的体积百分比为1%,即将供试品溶液用溶剂稀释100倍;供试品溶液280nm波长色谱图中若检出其他色谱峰,单个峰面积不得超过对照溶液中色氨酸峰面积的0.5倍,总峰面积不得超过对照溶液中色氨酸峰面积的5倍。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其特征在于,采用三氟乙酸-七氟丁酸离子对色谱法。

优选,色谱柱为反相C18色谱柱,进一步优选规格为4.6mm \times 250mm,3 μm ,更优选反相C18AQ色谱柱。

优选,检测器为紫外检测器。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其特征在于,流动相A为5.0mmol/L七氟丁酸-0.3%三氟乙酸-水,流动相B为乙腈;优选地,采用梯度洗脱,洗脱程序见下表:

时间(分)	A%	B%	流动相混合曲线
0.0	100	0	5
8	100	0	5
13	85	15	7
28	70	30	5
33	70	30	5
33.1	100	0	5
43	100	0	5

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其特征在于,流速为0.5-1.0ml/min,优选0.7-0.9ml/min,更优选0.8ml/min。

优选,柱温为35-45 $^{\circ}\text{C}$,更优选40 $^{\circ}\text{C}$ 。

一种复方氨基酸注射液中有有关物质的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种注射液中有有关物质的检测方法,尤其是复方氨基酸注射液中有有关物质的检测方法。

背景技术

[0002] 氨基酸是构成人体蛋白质的基本单元,也是机体合成抗体、激素、酶和其他组织的原料。复方氨基酸注射液一般用于蛋白质摄入不足、吸收障碍等氨基酸不能满足机体代谢需要的患者,亦用于改善手术后病人的营养状况。然而,各国药典均未收载复方氨基酸注射液有关物质检测方法。虽然有药典收载了氨基酸原料中有有关物质的检测方法,但这些有关物质为氨基酸生产过程中残留的工艺杂质,多为内源性氨基酸,被复方制剂处方中其他氨基酸原料所涵盖,从而无法满足复方氨基酸注射液中有有关物质检测的要求。

发明内容

[0003] 本发明提供了一种复方氨基酸注射液中有有关物质的检测方法,该方法确定了复方氨基酸注射液中的指针性杂质,检测灵敏度高,准确性和重现性好,能够满足复方氨基酸注射液中有有关物质控制的要求。

[0004] 本发明涉及一种复方氨基酸注射液中有有关物质的检测方法,该方法包括如下步骤:

[0005] (1) 供试品溶液和对照品溶液的制备:

[0006] 取复方氨基酸注射液直接用作供试品溶液;

[0007] 配制至少3个不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液和至少3个不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液;

[0008] (2) 取不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液的色谱图,以5-羟基色氨酸的浓度为横坐标,以该浓度所对应的峰面积为纵坐标,制作标准曲线或回归方程;取不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液注入高效液相色谱仪,记录365nm波长下不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液的色谱图,以L-犬尿氨酸的浓度为横坐标,以该浓度所对应的峰面积为纵坐标,制作标准曲线或回归方程;

[0009] (3) 取供试品溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下和365nm波长下供试品溶液的色谱图,按标准曲线法,以供试品溶液280nm波长色谱图中5-羟基色氨酸的峰面积根据标准曲线或回归方程计算供试品溶液中5-羟基色氨酸的量,不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%,以供试品溶液365nm波长色谱图中L-犬尿氨酸的峰面积根据标准曲线或回归方程计算供试品溶液中L-犬尿氨酸的量,不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%;

[0010] 其中,所述复方氨基酸注射液中含有色氨酸。

[0011] 本发明的发明人经过大量研究发现,色氨酸是20种氨基酸中最不稳定的氨基酸,

对于含有色氨酸的复方氨基酸注射液,5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸是最早出现、产生速度最快且量最多的杂质,从而将5-羟基色氨酸和L-犬尿氨酸确定为复方氨基酸注射液中的指针性杂质。

[0012] 本领域技术人员可以理解,各种含有色氨酸的复方氨基酸注射液都可用本发明的方法检测其中的有关物质,包括但不限于:复方氨基酸(15)双肽(2)注射液、复方氨基酸注射液(18AA)(规格包括5%和12%)、复方氨基酸注射液(18AA-I)、复方氨基酸注射液(18AA-II)(规格包括5%、8.5%、11.4%)、复方氨基酸注射液(18AA-III)、复方氨基酸注射液(18AA-V)、复方氨基酸注射液(18AA-VII)、复方氨基酸注射液(20AA)、复方氨基酸注射液(15AA)、复方氨基酸注射液(14AA)、复方氨基酸注射液(17AA)等等,优选,复方氨基酸(15)双肽(2)注射液。

[0013] 在一个优选的实施方式中,在步骤(1)中,进一步配制含有供试品溶液的对照溶液;在步骤(2)中,进一步取对照溶液注入高效液相色谱仪,记录280nm波长下对照溶液的色谱图;在步骤(3)中,按自身对照法,供试品溶液280nm波长色谱图中若检出其他色谱峰,单个峰面积通过与对照溶液中色氨酸峰面积相比,含量不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.5%,总峰面积通过与对照溶液中色氨酸峰面积相比,含量不得超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的5%。

[0014] 本领域技术人员可以理解,本领域常用的各种溶剂都能用来配制5-羟基色氨酸对照品溶液和L-犬尿氨酸对照品溶液。优选,对照品溶液的溶剂为稀盐酸水溶液,更优选浓度为0.1mol/L的盐酸水溶液。

[0015] 本领域技术人员可以理解,本领域常用的各种溶剂都能用来配制供试品溶液的对照溶液。优选,对照溶液的溶剂为稀盐酸水溶液,更优选浓度为0.1mol/L的盐酸水溶液。

[0016] 优选地,配制3-7个,进一步优选3-5个,更优选3个不同浓度的5-羟基色氨酸对照品溶液。本领域技术人员具备能力选取用于制作标准曲线或回归方程的多个对照品溶液中5-羟基色氨酸的浓度。优选地,最小浓度应低于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.1%,最大浓度应高于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.4%。例如,对于复方氨基酸(15)双肽(2)注射液,其中色氨酸标示量为0.95g/500ml,此时用于制作标准曲线或回归方程的3个对照品溶液中5-羟基色氨酸的浓度范围可以分别是0.2-0.8 μ g/ml、1.6-2.4 μ g/ml、8-10 μ g/ml,例如,3个对照品溶液中5-羟基色氨酸的浓度可以分别是约0.5 μ g/ml、约2.0 μ g/ml、约9.0 μ g/ml。本发明的方法,线性范围超过色氨酸标示量的0.1-0.4%。

[0017] 优选地,配制3-7个,进一步优选3-5个,更优选3个不同浓度的L-犬尿氨酸对照品溶液。本领域技术人员具备能力选取用于制作标准曲线或回归方程的多个对照品溶液中L-犬尿氨酸的浓度。优选地,最小浓度应低于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.1%,最大浓度应高于复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.4%。例如,对于复方氨基酸(15)双肽(2)注射液,其中色氨酸标示量为0.95g/500ml,此时用于制作标准曲线或回归方程的3个对照品溶液中L-犬尿氨酸的浓度范围可以分别是0.2-0.8 μ g/ml、1.6-2.4 μ g/ml、8-10 μ g/ml,例如,3个对照品溶液中L-犬尿氨酸的浓度可以分别是约0.5 μ g/ml、约2.0 μ g/ml、约9.0 μ g/ml。本发明的方法,线性范围超过色氨酸标示量的0.1-0.4%。

[0018] 优选地,对照溶液中供试品溶液占对照溶液的体积百分比为1%,即将供试品溶液用溶剂稀释100倍。供试品溶液280nm波长色谱图中若检出其他色谱峰,单个峰面积不得超

过对照溶液中色氨酸峰面积的0.5倍,总峰面积不得超过对照溶液中色氨酸峰面积的5倍。

[0019] 优选地,色谱条件为:采用三氟乙酸-七氟丁酸离子对色谱法;色谱柱为反相C18色谱柱,优选规格为4.6mm×250mm,3 μ m,更优选反相C18AQ色谱柱;检测器为紫外检测器。

[0020] 优选地,流动相A为5.0mmol/L七氟丁酸-0.3%三氟乙酸-水,流动相B为乙腈;优选地,采用梯度洗脱,洗脱程序见下表1;优选地,流速为0.5-1.0ml/min,进一步优选0.7-0.9ml/min,更优选0.8ml/min。优选地,柱温为35-45 $^{\circ}$ C,更优选40 $^{\circ}$ C。

[0021] 表1梯度洗脱程序

时间(分)	A%	B%	流动相混合曲线
0.0	100	0	5
8	100	0	5
[0022] 13	85	15	7
28	70	30	5
33	70	30	5
33.1	100	0	5
43	100	0	5

[0023] 本发明通过大量研究,确定了5-羟基色氨酸和L-犬尿氨酸为复方氨基酸注射液中的指针性杂质,通过对复方氨基酸注射液中5-羟基色氨酸和L-犬尿氨酸进行检测和控制能够检测和控制复方氨基酸注射液中的有关物质。特别是,本发明通过三氟乙酸-七氟丁酸离子对色谱方法优化了氨基酸注射液中所含有的各种氨基酸和有关物质的分离和基线稳定性,提高了检测灵敏度。通过方法学验证,发现本发明的方法灵敏、准确、重现性较好,能够满足复方氨基酸注射液有关物质控制的要求。

附图说明

[0024] 图1 280nm波长下5-羟基色氨酸对照品溶液色谱图

[0025] 图2 365nm波长下L-犬尿氨酸对照品溶液色谱图

[0026] 图3 280nm波长下供试品溶液色谱图

[0027] 图4 5-羟基色氨酸标准曲线图

[0028] 图5犬尿氨酸标准曲线图

[0029] 图6 280nm波长下敞口搅拌1小时后的供试品溶液色谱图

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外,应理解,在阅读了本发明所记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本发明所限定的范围。

[0031] 实施例1复方氨基酸注射液中有有关物质的检测

[0032] 1. 仪器

[0033] Thermo dionex UltiMate 3000型高效液相色谱仪(在线脱气机、双三元梯度泵、DIONEX UltiMate 3000Diode Array Detector,DIONEX UltiMate 3000Autosampler,DIONEX UltiMate 3000Column Compartment,Chromeleon 7.2色谱工作站)

(ThermoFisher, 美国);天平(XP205, METTLER TOLEDO公司, 瑞士);Milli-Q超纯水器(Integral 10, Merck Millipore公司, 德国);水相针式过滤器(聚醚砜, 批号:9G020320, 上海安普科学仪器有限公司, 中国)。

[0034] 2. 试剂

[0035] 乙腈(默克化工技术(上海)有限公司, HPLC纯度99.9%, 批号:1312001YT);三氟乙酸(北京市百灵威科技有限公司, 99%, 批号:L4900140);七氟丁酸(北京迪马科技有限公司, 99.5%, 批号:7281190);盐酸:北京化工厂, 批号20140910, 含量w/%:38.0;水为超纯水(大于18.2M Ω ·cm)。

[0036] 3. 对照品

[0037] L-犬尿氨酸(Sigma, HPLC纯度98%, 批号:BCBP8307V)、5-羟基-L-色氨酸(Aldrich, HPLC纯度98%, 批号:BCBP2662V)。

[0038] 4. 试药

[0039] 复方氨基酸(15)双肽(2)注射液(批号:14121601, 双鹤药业), 色氨酸标示量为0.95g/500ml。

[0040] 5. 复方氨基酸注射液中有关物质的检测

[0041] 取复方氨基酸注射液直接用作供试品溶液。精密量取供试品溶液1ml置于100ml量瓶中, 用0.1mol/L盐酸水溶液稀释至刻度, 摇匀, 用作为对照溶液。精密称取5-羟基色氨酸, 用0.1mol/L盐酸水溶液配制成5-羟基色氨酸浓度分别为0.5105 μ g/ml、2.002 μ g/ml、9.544 μ g/ml的5-羟基色氨酸对照品溶液;精密称取L-犬尿氨酸, 用0.1mol/L盐酸水溶液配制成L-犬尿氨酸浓度分别为0.5285 μ g/ml、2.016 μ g/ml、9.304 μ g/ml的L-犬尿氨酸对照品溶液。

[0042] 采用Capcell PAK C18AQ S3(4.6mm \times 250mm, 3 μ m)色谱柱;流动相A:5.0mmol/L七氟丁酸-0.3%三氟乙酸-水, 流动相B:乙腈, 梯度洗脱, 洗脱程序见下表2;流速0.8ml/min;柱温40 $^{\circ}$ C;检测波长:280nm和365nm;在280nm波长色谱图中, 理论板数按5-羟基色氨酸峰计算应不低于10000, 5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸与相邻色谱峰的分离度 >1.5 。

[0043] 表2梯度洗脱程序

	时间(分)	A%	B%	流动相混合曲线
	0.0	100	0	5
	8	100	0	5
[0044]	13	85	15	7
	28	70	30	5
	33	70	30	5
	33.1	100	0	5
	43	100	0	5

[0045] 精密量取供试品溶液、对照溶液和两种对照品溶液各10 μ l, 分别注入液相色谱仪, 记录280nm波长下供试品溶液、对照溶液和5-羟基色氨酸对照品溶液的色谱图, 以及365nm波长下供试品溶液和L-犬尿氨酸对照品溶液的色谱图。其中280nm波长下浓度为2.0 μ g/ml的5-羟基色氨酸对照品溶液的色谱图, 365nm波长下浓度为2.0 μ g/ml的L-犬尿氨酸对照品溶液的色谱图, 以及280nm波长下供试品溶液的色谱图, 请见附图1-3。

[0046] 以浓度分别为0.5105 μ g/ml、2.002 μ g/ml、9.544 μ g/ml的5-羟基色氨酸对照品溶液

280nm波长色谱图中5-羟基色氨酸峰面积为纵坐标,以5-羟基色氨酸浓度为横坐标,制作标准曲线(见附图4),按标准曲线法以供试品溶液280nm波长色谱图中5-羟基色氨酸的峰面积根据该标准曲线确定供试品溶液中含有的5-羟基色氨酸量。本实施例中检测的批号为14121601的复方氨基酸(15)双肽(2)注射液中未检出5-羟基色氨酸峰,即5-羟基色氨酸的量不超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%。

[0047] 以浓度分别为0.5285 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、9.304 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的L-犬尿氨酸对照品溶液365nm波长色谱图中L-犬尿氨酸峰面积为纵坐标,以L-犬尿氨酸浓度为横坐标,制作标准曲线(见附图5),按标准曲线法以供试品溶液365nm波长色谱图中L-犬尿氨酸的峰面积根据该标准曲线确定供试品溶液中含有的L-犬尿氨酸量。本实施例中检测的批号为14121601的复方氨基酸(15)双肽(2)注射液中未检出L-犬尿氨酸峰,即L-犬尿氨酸的量不超过复方氨基酸注射液中色氨酸标示量的0.2%。

[0048] 供试品溶液280nm波长色谱图中检出的其他色谱峰,单个峰面积均不超过对照溶液中色氨酸峰面积的0.5倍,总峰面积不超过对照溶液中色氨酸峰面积的5倍。

[0049] 将上述同一批号的复方氨基酸注射液在室温敞口放置,因充分考察氧化不稳定性,置磁力搅拌器上搅拌1h,按照上述同样的方法对其中含有的有关物质进行检测,发现其供试品溶液在280nm波长下(见图6)检出5-羟基色氨酸峰,按照标准曲线法计算其浓度为1.078 $\mu\text{g}/\text{ml}$;在365nm波长下检出L-犬尿氨酸,按照标准曲线法计算其浓度为0.5907 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0050] 实施例2方法学验证

[0051] 参照《中国药典》2015年版四部附录,对本发明的检测方法进行方法学研究。其中,所用-复方氨基酸(15)双肽(2)注射液(批号:14121601、14121701、14121801,来自双鹤药业)

[0052] 1. 专属性试验

[0053] 分别取空白溶剂(0.1mol/L盐酸水溶液)、5-羟基色氨酸对照品溶液(浓度为40.72 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、L-犬尿氨酸对照品溶液(浓度为60.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、供试品溶液、供试品溶液:5-羟基色氨酸定位溶液(浓度为400 $\mu\text{g}/\text{ml}$):L-犬尿氨酸定位溶液(浓度为400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)为1:1:1的混合溶液注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,记录280nm波长下的色谱图,发现空白溶剂及供试品溶液中的其他氨基酸对5-羟基-色氨酸和L-犬尿氨酸的测定无干扰,表明本发明的专属性良好。

[0054] 2. 系统适用性试验

[0055] 配制含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为3.802 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.722 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,记录280nm、365nm波长下的色谱图,5-羟基色氨酸的理论塔板数为456909,L-犬尿氨酸的理论塔板数为323966,二者的分离度为8.52。

[0056] 3. 重复性考察

[0057] 平行配制6份含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为3.802、3.722 $\mu\text{g}/\text{ml}$,含20%供试品溶液的加标供试品溶液,分别注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,5-羟基色氨酸(280nm波长下)、L-犬尿氨酸(365nm波长下)峰面积RSD分别为0.30%、1.89%。

[0058] 4. 定量限

[0059] 配制含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为0.8144、1.216mg/ml的定量限溶液,不断稀释并注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,直至信噪比 $S/N \geq 10$ 。5-羟基色氨酸

(280nm波长下)、L-犬尿氨酸(365nm波长下)的定量限分别为0.1629 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.2432 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0060] 5. 检测限

[0061] 配制含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为0.8144、1.216 mg/ml 的定量限溶液,不断稀释并注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,直至信噪比 $S/N \geq 3$ 。5-羟基色氨酸(280nm波长下)、L-犬尿氨酸(365nm波长下)的检测限分别为0.08144 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1216 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0062] 6. 精密度考察

[0063] 取对照溶液(供试品溶液用0.1 mol/L 盐酸水溶液稀释100倍)和含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为3.802、3.722 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液注入液相色谱仪,分别重复进样6次,色谱条件同实施例1,对照品溶液中5-羟基色氨酸(280nm波长下)、L-犬尿氨酸(365nm波长下)峰面积RSD分别为0.10%、0.33%,对照溶液中色氨酸(280nm波长下)峰面积RSD为0.15%。

[0064] 7. 线性试验

[0065] 配制含5-羟基色氨酸浓度分别为814.4、407.2、203.6、40.72、8.144、4.072、1.629、0.8144、0.3258、0.1629 $\mu\text{g}/\text{ml}$,L-犬尿氨酸浓度分别为1216、608.0、304.0、60.80、12.16、6.080、2.432、1.216、0.4864、0.2432 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列对照溶液,注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,5-羟基色氨酸浓度与峰面积的线性关系良好,回归方程: $Y=0.2858X-0.0011$,相关系数 $r=1.0000$,方法线性范围:0.1629~814.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$;L-犬尿氨酸浓度与峰面积的线性关系良好,回归方程: $Y=0.2014X-0.2513$,相关系数 $r=0.9999$,方法线性范围:0.2432~1216 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0066] 8. 供试品溶液稳定性

[0067] 取室温放置0小时、3小时、7小时、14小时、16小时、20小时、21小时、24小时的供试品溶液和含5-羟基色氨酸浓度分别为0.5105、2.002、9.544 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,含L-犬尿氨酸浓度分别为0.5285、2.2016、9.304 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,分别注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,测定供试品样品中5-OH-Trp和L-KY的峰面积。24小时内放置的供试品中均未检出5-OH-Trp和L-KY,复方氨基酸注射液室温条件下稳定性良好。

[0068] 9. 准确度

[0069] 精密量取2.0 mL 的供试品(批号:14121701)9份,分别置于10 mL 的容量瓶中,加入精密量取(5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度为19.92、19.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的对照品约1.0、2.0、4.0 mL 各3份,用0.1 mol/L HCl稀释至刻度,制成质量浓度约为1.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、7.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,作为准确度测定溶液,分别注入液相色谱仪,色谱条件同实施例1,5-羟基色氨酸的平均回收率为98.86%, $RSD=0.78\%$ ($n=9$),L-犬尿氨酸的平均回收率为104.8%, $RSD=1.78\%$ ($n=9$)。

[0070] 10. 耐用性试验

[0071] 配制含5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸浓度分别为3.802、3.722 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,取批号为14121701的供试品,滤过,分别注入液相色谱仪,色谱条件分别考察流速 $\pm 0.1\text{ml}/\text{min}$,柱温 $\pm 5^\circ\text{C}$ 条件下,对照品溶液中5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸峰面积的影响及供试品溶液中5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸峰面积的影响。

[0072] 结果显示,检测条件在一定范围内(流速 $\pm 0.1\text{ml}/\text{min}$,柱温 $\pm 5^\circ\text{C}$)发生变化,对5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的测定影响不大。

[0073]

验证项目	可接受标准	验证结果
专属性实验	考察空白溶剂、5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸、供试品溶液、供试品+STD	方法专属性良
	空白溶剂及其他氨基酸对5-羟基-色氨酸、L-犬尿氨酸测定无干扰	空白溶剂及其他氨基酸对5-羟基-色氨酸、L-犬尿氨酸测定无干扰
系统适用性试验	5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸色谱峰理论塔板数和分离度符合规定	5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸色谱峰理论塔板数分别为456909、323966
	塔板数 ≥ 10000 ；与相邻色谱峰分离度应符合规定	5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸分离度8.52
重复性	测定6份供试品溶液，5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸测定结果符合限度要求， $RSD \leq 2.0\%$	5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸峰面积RSD分别为0.30%、1.89%
定量限	$S/N \geq 10$ (Average $\geq 10SD$)	本方法5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的定量限分别为0.1629 $\mu\text{g/ml}$ 、0.2432 $\mu\text{g/ml}$
检测限	$S/N \geq 3$ (Average $\geq 3SD$)	本方法5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的检测限分别为0.08144 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1216 $\mu\text{g/ml}$
样品溶液稳定性	供试品溶液，24小时溶液稳定性	供试品溶液室温放置24小时未检出5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸
精密度	对照品溶液连续进样6针，5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸峰面积 $RSD \leq 2.0\%$	5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸峰面积RSD分别为0.10%、0.33%
线性试验	范围：5-羟基色氨酸：目标浓度50%~200%以外；L-犬尿氨酸：目标浓度50%~200%以外	在0.1629~814.4 $\mu\text{g/ml}$ 范围内5-羟基色氨酸浓度与峰面积线性相关， $\gamma=1$
	$\gamma \geq 0.9990$	在0.2432~1216 $\mu\text{g/ml}$ 范围内L-犬尿氨酸浓度与峰面积线性相关， $\gamma=0.9999$
准确度	目标浓度50%~200%内，回收率应为90~110%， $RSD \leq 10\%$	5-羟基色氨酸平均回收率和RSD分别为98.86%、0.78%、L-犬尿氨酸平均回收率和RSD分别为104.8%、1.78%
耐用性实验	流速的微小变化，对5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的测定影响不大	各变动因素下对5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的测定影响不大
	柱温的微小变化，对5-羟基色氨酸、L-犬尿氨酸的测定影响不大	各变动因素下，系统适用性均符合要求
样品测定	含量测定结果符合限度	含量测定结果符合限度

[0074] 以上,对本发明的实施方式进行了说明。但是,本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

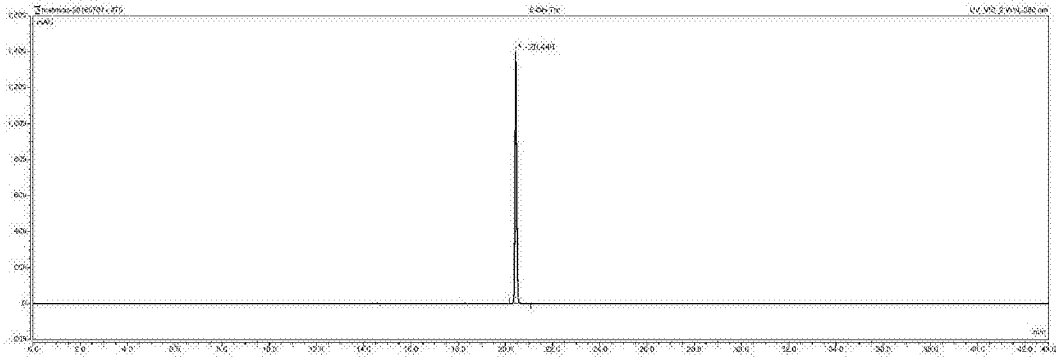


图1

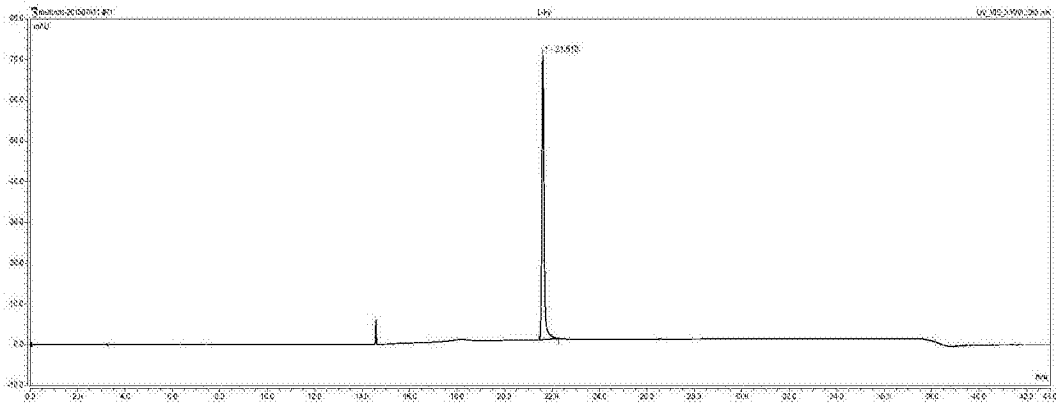


图2

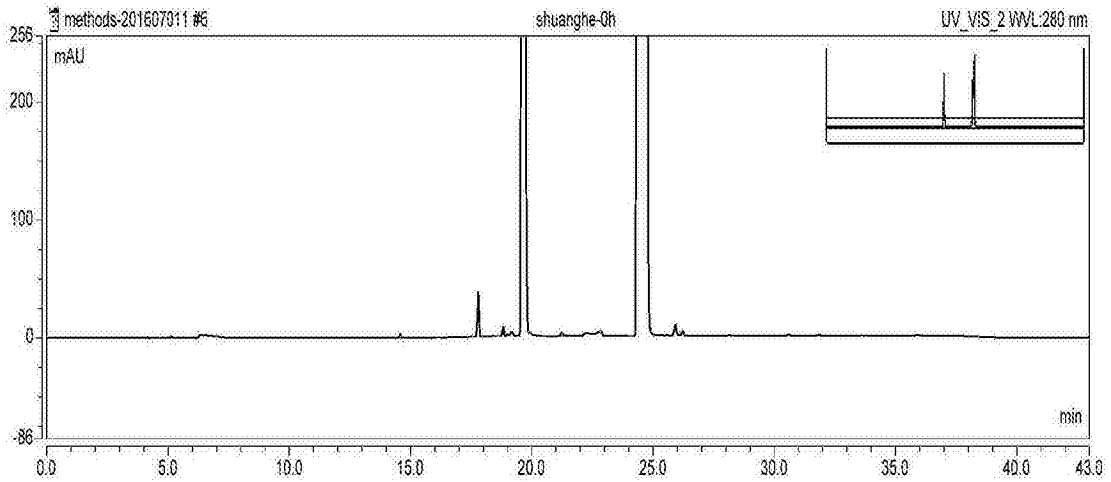


图3

