

Determination of L-Ornithine-L-Asparate by HPLC

Yu Yu, Haoyu Yuan*, Jianpeng Zeng

416 Hospital of Nucleus Industry Ministry, Chengdu Sichuan
Email: yhy416@126.com

Received: Oct. 20th, 2016; accepted: Nov. 8th, 2016; published: Nov. 15th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To establish a HPLC method for assay of L-Ornithine-L-Asparate. **Methods:** The HPLC method was conducted on Waters Spherisorb NH2 (250 mm × 4.6 mm, id 5 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile-0.05 mol/L KH₂PO₄ (60:40) with the flow of 1.0 mL/min. The detection wave-length was 210 nm. **Results:** L-ornithine and L-aspartate showed good linear ($r = 0.9998$) in the range of 0.75 - 2.26 mg/mL and 0.75 - 2.24 mg/mL, respectively. The average recovery of L-Ornithine-L-Asparate was 99.37% ($RSD = 0.34\%$). **Conclusion:** The method was simple, rapid and accurate. It is suitable for the assay of L-Ornithine-L-Asparate.

Keywords

HPLC, L-Ornithine-L-Asparate, Assay

HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量

俞 瑜, 袁浩宇*, 曾建鹏

核工业四一六医院, 四川 成都
Email: yhy416@126.com

收稿日期: 2016年10月20日; 录用日期: 2016年11月8日; 发布日期: 2016年11月15日

*通讯作者。

文章引用: 俞瑜, 袁浩宇, 曾建鹏. HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量[J]. 药物资讯, 2016, 5(4): 62-66.
<http://dx.doi.org/10.12677/pi.2016.54011>

摘要

目的：建立HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量。方法：采用氨基键合硅胶色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以0.05M磷酸二氢钾缓冲溶液 - 乙腈(40:60)为流动相；检测波长为210 nm；流速为1.0 ml/min；进样量为20 μL。结果：门冬氨酸鸟氨酸浓度在1.50~4.50 mg/mL范围内，即门冬氨酸浓度为0.75~2.26 mg/mL ($r = 0.9998$), 鸟氨酸浓度为0.75~2.24 mg/mL ($r = 0.9998$), 峰面积与浓度呈良好的线性关系。平均回收率为99.37%, RSD为0.34%。结论：该方法简便、快速、准确，适合于门冬氨酸鸟氨酸原料及制剂的含量测定。

关键词

高效液相色谱法，门冬氨酸鸟氨酸，含量测定

1. 引言

门冬氨酸鸟氨酸(L-Ornithine-L-Asparate)化学名为(s)-2, 5-二氨基戊酸-(s)-2-氨基丁二酸盐，是门冬氨酸和鸟氨酸的复合体，主要用于治疗因急、慢性肝病如肝硬化、脂肪肝、肝炎等所致的高血氨症，特别适用于因肝脏疾患引起的中枢神经系统症状的解除及肝昏迷的抢救[1] [2] [3]。门冬氨酸鸟氨酸在体内分解为门冬氨酸和鸟氨酸而发挥作用，鸟氨酸是尿素循环中的起始底物，它与血循环中有毒的氨结合，将后者转化为对人体无毒的物质。门冬氨酸能参与肝细胞内核酸的合成，有利于修复被损伤的肝细胞。此外，由于天门冬氨酸对肝细胞内三羧酸循环代谢过程的间接促进作用，促进了肝细胞内的能量生成，使得被损伤的肝细胞的各项功能得以迅速恢复[4]。笔者在参考文献的基础上[5] [6] [7]，建立了灵敏、准确的HPLC法测定门冬氨酸鸟氨酸原料药的含量。

2. 仪器与试剂

岛津 LC-10A 型高效液相色谱仪；Waters Spherisorb NH2 色谱柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm)；日本岛津 LC-solution 色谱工作站；赛多利斯 BSA224S 电子天平。门冬氨酸鸟氨酸对照品(批号：140691-200401)，由中国药品生物制品检定所提供；门冬氨酸鸟氨酸原料(批号：131202, 140125, 140318)，由湖北兴银河化工有限公司提供；乙腈为色谱纯，美国 Fisher 公司；水为重蒸水；其余试剂均为分析纯。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件与系统适用性

色谱柱为 Waters Spherisorb NH2, 250 mm × 4.6 mm, id 5 μm；流动相为 0.05M 磷酸二氢钾缓冲溶液 - 乙腈(40:60)；检测波长：210 nm；流速为 1.0 ml/min；进样量为 20 μL。理论塔板数按理论板数按门冬氨酸峰计不低于 5000，门冬氨酸与鸟氨酸与其他杂质峰的分度应大于 1.5。在上述条件下，门冬氨酸和鸟氨酸的保留时间分别为 15.7 和 17.8 min，两者的分离度符合要求(图 1)。

3.2. 线性关系

取门冬氨酸鸟氨酸对照品适量，精密称定，用乙腈 - 水(50:50)配制含门冬氨酸鸟氨酸 1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、4.50 mg/mL 的溶液，即含门冬氨酸浓度为 0.75~2.26 mg/mL，含鸟氨酸浓度为 0.75~2.24 mg/mL 的溶液，依次进样，记录色谱图，分别以门冬氨酸和鸟氨酸的峰面积对浓度进行线性回归，得线性方程

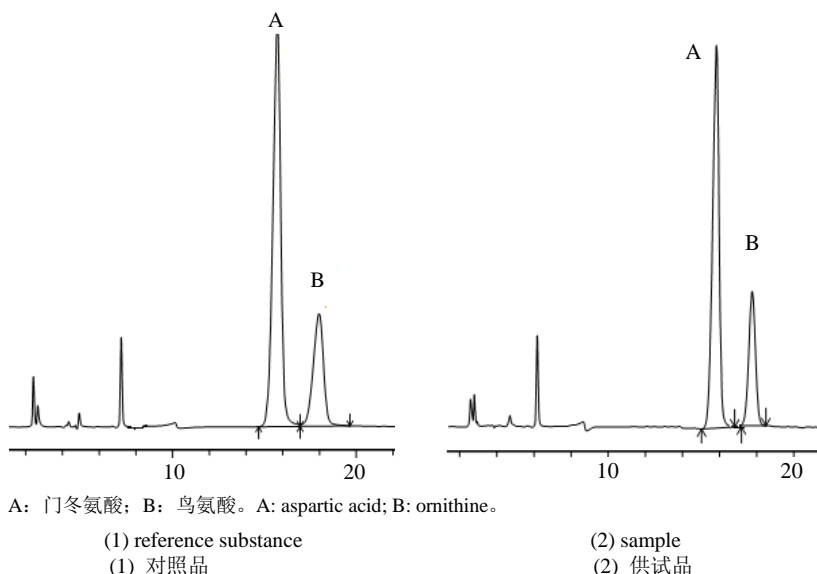


Figure 1. HPLC chromatogram of L-Ornithine-L-Aspartate
图 1. 门冬氨酸鸟氨酸的色谱图

为：门冬氨酸： $A = 2.05 \times 10^6 C - 91432$ ， r 为 0.9998；鸟氨酸： $A = 601675C - 61023$ ， r 为 0.9998。表明门冬氨酸鸟氨酸浓度在 1.50~4.50 mg/mL 范围内，即门冬氨酸浓度为 0.75~2.26 mg/mL，鸟氨酸浓度为 0.75~2.24 mg/mL，峰面积与浓度呈良好的线性关系。

3.3. 精密度

3.3.1. 重复性试验

取本品精密称定，分别配制 6 份供试品溶液，各精密量取 20 μ L，注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法分别计算门冬氨酸和鸟氨酸的含量。两者含量之和为门冬氨酸鸟氨酸的含量，并计算 RSD。结果门冬氨酸鸟氨酸的平均含量为 99.23%，RSD 为 1.16%，本方法的重复性良好。

3.3.2. 中间精密度

取本品精密称定，用乙腈 - 水(50:50)稀释制成每 1 mL 含有门冬氨酸鸟氨酸 2 mg 的溶液 6 份，由两名试验人员在不同日期测定，记录色谱图。计算门冬氨酸鸟氨酸的含量，并计算 RSD。结果 RSD 为 1.57% ($n = 12$)，表明本法的中间精密度较好，可满足含量测定的要求。

3.4. 回收率试验

分别精密称取门冬氨酸鸟氨酸原料 16、20、24 mg，各 3 份，分别置于 10 ml 量瓶中，加乙腈 - 水(50:50)稀释至刻度，摇匀，滤过。精密量取续滤液 20 μ L，注入液相色谱仪，记录色谱图。另精密称取门冬氨酸鸟氨酸对照品 20 mg，置 10 ml 量瓶中，加乙腈 - 水(50:50)稀释至刻度，摇匀，滤过。按外标法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量。结果见表 1。该方法的回收率在 98%~101%之间，RSD% 小于 1.0%，本法的准确度良好。

3.5. 稳定性

取门冬氨酸鸟氨酸对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，加乙腈 - 水(50:50)溶解并稀释制成每 1 mL 中含有门冬氨酸鸟氨酸 2 mg 的溶液，摇匀。于 5 $^{\circ}$ C 样品池中放置，分别在 0、2、4、8、12、20 小时精密

Table 1. Results of recovery test**表 1.** 回收率试验结果

样品	测得量 (mg)	投入量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
80%-1	15.94	16.04	99.38		
80%-2	16.02	16.11	99.44		
80%-3	16.05	16.20	99.07		
100%-1	20.25	20.48	98.87		
100%-2	20.48	20.63	99.27	99.37	0.34
100%-3	19.82	19.95	99.34		
120%-1	24.18	24.31	99.46		
120%-2	24.02	23.99	100.12		
120%-3	24.52	24.67	99.39		

Table 2. Content determination of samples (n = 3)**表 2.** 含量测定结果(n = 3)

样品批号	131202	140310	140311
含量(%)	99.29	99.31	99.37

量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。计算峰面积的 *RSD*, 结果门冬氨酸峰面积的 *RSD* 为 0.71%, 鸟氨酸峰面积的 *RSD* 为 0.58%, 样品在 20 小时内稳定性良好。

3.6. 含量测定

采用所建的 HPLC 方法, 测定三批样品的含量, 结果见表 2, 含量均符合规定。

4. 讨论

门冬氨酸鸟氨酸是门冬氨酸和鸟氨酸的复合体, 在 HPLC 色谱图中出现 2 个峰, 分别为门冬氨酸和鸟氨酸峰。在计算含量时, 按外标法分别计算门冬氨酸和鸟氨酸的含量, 其中门冬氨酸鸟氨酸分子中门冬氨酸量按系数 0.5017 折算, 鸟氨酸量按系数 0.4983 折算, 两者之和即为门冬氨酸鸟氨酸的含量。

分别取门冬氨酸与 L-盐酸鸟氨酸对照品适量, 加乙腈-水(50:50)溶解并稀释制成每 1 mL 中约含门冬氨酸 1 mg 和鸟氨酸 1 mg 的溶液, 通过 DAD 检测器在全波长范围内进行扫描, 结果门冬氨酸与鸟氨酸在 200~210 nm 波长范围内均有较强吸收, 考虑到 200 nm 属于末端吸收受溶剂等影响较大, 故选择 200 nm 作为测定波长。

笔者对流动相比比例进行了筛选, 分别对乙腈:0.05M 磷酸二氢钾比例 60:40, 55:45, 50:50, 45:55 等进行考察, 发现流动相成分比例对本法含量测定有较大影响。当水相比比例 $\leq 40\%$ 时, 出峰顺序依次为门冬氨酸、鸟氨酸, 乙腈:当 0.05M 磷酸二氢钾 = 60:40 时, 两者的分离度 > 1 , 峰对称性较好; 水相比比例 $\geq 50\%$ 时, 两个主峰出现了颠倒, 出峰顺序依次为鸟氨酸、门冬氨酸, 如乙腈:0.05M 磷酸二氢钾 = 50:50, 与参考文献[6]结果一致。虽然能够实现基线分离, 但考虑到使用的色谱柱是氨基柱, 流动相中水相的比例越高越容易发生水解, 为延长色谱柱的寿命, 最终选择乙腈:0.05M 磷酸二氢钾 = 60:40 为流动相。

本研究建立了 HPLC 法测定门冬氨酸鸟氨酸的含量, 能有效分离色谱峰, 方法准确、简便, 适用于门冬氨酸鸟氨酸原料药的含量测定。

参考文献 (References)

- [1] 丁一娟, 于皆平, 罗和生, 等. 门冬氨酸鸟氨酸治疗肝硬化并肝性脑病及肝功能异常[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(7): 656-657.
- [2] 晏泽辉, 王宇明, 毛青, 等. 门冬氨酸鸟氨酸巩固治疗高 γ -谷氨酰转移酶慢性肝病的疗效观察[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(7): 525-528.
- [3] 王永英, 赵敬武, 徐学君. 门冬氨酸鸟氨酸治疗乙型肝炎肝硬化临床疗效观察[J]. 安徽医药, 2013, 17(1): 128-129.
- [4] 蒋音, 陈良, 巫善明. 门冬氨酸鸟氨酸的药理作用与临床应用[J]. 世界感染杂志, 2007, 7(5): 415-418.
- [5] 张莉, 黄哲苏, 李海生. 异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定门冬氨酸鸟氨酸注射液含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7): 1174-1176.
- [6] 缪宁梅, 马婕. 高效液相色谱法测定门冬氨酸鸟氨酸注射液的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 52-53.
- [7] 覃婷婷, 韩晓捷, 黄哲甦. 柱后衍生化高效液相色谱法测定门冬氨酸鸟氨酸颗粒剂的有关物质及含量[J]. 天津医药, 2011, 23(5): 4-7.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: pi@hanspub.org