

HPLC 法测定门冬氨酸钾镁注射液中门冬氨酸有关物质及含量*

肖菁¹, 朱志玲², 王蓉蓉¹, 缪建荣¹, 左利民², 刘桂霞², 山广志^{2**}

(1. 湖南省药品检验研究院, 长沙 410001; 2. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 目的: 建立门冬氨酸钾镁注射液中门冬氨酸有关物质含量测定的 HPLC 方法。方法: 采用 SPHERISORB NH₂ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾(60:40); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 210 nm; 柱温为 30 °C, 进样量为 5 μL; 对最大单个杂质采用在线二维脱盐 HPLC 与 MS 联用进行初步推断。结果: 在该选定色谱条件下, 主峰与有关物质峰分离度良好; 门冬氨酸在 0.338 64~3.386 4 mg·mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好($r=0.9998$); 平均回收率为 99.6% ($n=9$), 检测限为 23.5 ng; 初步推断最大单个杂质为富马酸。结论: 本方法专属、灵敏、简便, 可用于测定门冬氨酸钾镁注射液中门冬氨酸含量和有关物质。
关键词: 门冬氨酸钾镁注射剂; 有关物质; 富马酸; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)03-0477-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.03.15

HPLC determination of aspartate in potassium aspartate and magnesium aspartate injection and its related substances*

XIAO Jing¹, ZHU Zhi-ling², WANG Rong-rong¹, MIAO Jian-rong¹,
ZUO Li-ming², LIU Gui-xia², SHAN Guang-zhi^{2**}

(1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha, 410001, China;

2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of aspartate in potassium aspartate and magnesium aspartate injection and its related substances. **Methods:** The separation was performed on a Waters SPHERISORB NH₂ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ phosphate solution (60:40) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 210 nm. The column temperature was 30 °C. The volume of injection was 5 μL. On-line two-dimensional desalting HPLC/MS was applied to infer the maximum single impurity preliminarily. **Results:** Under above conditions, the main peak and the peaks of the related substances were well separated. Aspartate had a good linear relationship ($r=0.9998$)

* “重大新药创制”国家科技重大专项(2012ZX09301002-001-019); 2015 年国家药品抽验计划

** 通信作者 Tel:(010)63021345; E-mail: Shanguangzh@imb.pumc.edu.cn

第一作者 肖菁 Tel:(0731)89912568; E-mail: 16275126@qq.com

朱志玲 Tel:(010)67019851; E-mail: zhiling.zhu@live.com

within the range of 0.338 64–3.386 4 mg · mL⁻¹. The average recovery ($n=9$) was 99.6%. The limit of the detection was 23.5 ng. The maximum single impurity in related substances was preliminarily inferred as fumaric acid.

Conclusion: The method is sensitive, specific and simple. It can be used for determining aspartate in potassium aspartate and magnesium aspartate injection and its related substances.

Keywords: aspartate; potassium aspartate and magnesium aspartate injection; related substances; fumaric acid; assay; HPLC

门冬氨酸钾镁注射剂是门冬氨酸钾盐和镁盐的混合物,在临床上属电解质补充药^[1-2],可用于低钾血症、洋地黄中毒引起的心律失常(主要是室性心律失常)和心肌炎后遗症、充血性心力衰竭、心肌梗塞的辅助治疗^[3-5]。门冬氨酸钾镁注射液现收载于《卫生部药品标准》二部第五册^[6],法定标准中采用氮测定法测定门冬氨酸的含量,但对其有关物质缺乏控制。门冬氨酸及其盐离子极性较强,紫外吸收较弱,本文采用氨基柱和末端吸收条件建立了门冬氨酸钾镁注射液有关物质和含量测定的高效液相色谱法,同时采用在线二维脱盐-HRMS联用方法,对最大单个杂质进行初步推断,为合理有效控制门冬氨酸钾镁注射剂质量提供技术手段。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1260 系列高效液相色谱仪, DAD 检测器; Thermo U3000 VWD 双三元高效液相色谱仪; Thermo LTQ Orbitrap 高分辨质谱仪; Mettler MS205 电子分析天平。Spherisorb NH₂ 柱(氨基键合硅胶为填充剂; 4.6 mm × 250 mm, 5 μm; Waters 公司)。

1.2 试剂 门冬氨酸钾镁注射剂由国内的 3 家企业提供,共 9 批,规格均为: 10 mL: 门冬氨酸 850 mg、钾 114 mg、镁 42 mg; 门冬氨酸对照品由中国食品药品检定研究院提供,批号: 140691-20041,含量: 100%; 富马酸对照品: Dr. Ehrenstorfer,批号: 20618,含量: 99.8%; 乙腈: 色谱纯,其他试剂: 分析纯,水为重蒸馏水。

2 检测条件

2.1 有关物质和含量测定色谱条件^[7-9]

Waters Spherisorb NH₂ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.05 mol · L⁻¹ 的磷酸二氢钾(60:40); 测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样量: 5 μL。

2.2 在线二维脱盐技术色谱条件^[10-11]

2.2.1 一维色谱条件 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 波长: 214 nm; 流动相: 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液

(pH4.5)-乙腈(40:60)。

2.2.2 二维色谱条件 流速: 0.4 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 流动相: 乙腈 - 200 mmol · L⁻¹ 醋酸铵(pH 4.5)-水,按表 1 梯度洗脱。

表 1 二维色谱条件流动相梯度

Tab. 1 Two-dimensional chromatographic conditions of mobile phase gradient

时间 (time) / min	流动相组成 (mobile phase composition)	流动相比比例 (mobile phase ratio)
0~63.3	乙腈 - 200 mmol · L ⁻¹ 醋酸铵 - 水 (acetonitrile - 200 mmol · L ⁻¹ ammonium acetate - water)	55:5:40
63.4~73.4		55:5:40 → 5:90:5
73.5~83		55:5:40

2.2.3 在线二维阀切换 利用 Dionex 的双三元高效液相色谱仪的切换技术(见图 1),右泵连接一维分析柱,使用“2.2.1”项下一维色谱条件;左泵连接二维分析柱,使用“2.2.2”项下二维色谱条件。2 个不同的色谱系统首先分别由左右双泵流出的不同流动相平衡。当六通阀 I 的阀位置在 1~6 时,样品组分由进样器与右泵流动相进行一维 UV 数据采集;当目标组分(最大单个杂质)分流出维分析柱时,六通阀 I 切换至 1~2,目标组分转移至 Loop 环中;六通阀 I 再次切回 1~6,目标组分转移至二维色谱柱上进行 2 次分离,再通过六通阀 II 进入质谱分析。目标峰在一维色谱柱保留时间为 57.6 min。0~58.1 min 六通阀 I 采用 1~2 连接,58.1~58.3 min 六通阀 I 采用 1~6 连接,58.3 min 后六通阀 I 切换为 1~2 连接。0~72.0 min 六通阀 II 采用 1~2 连接,72.0 min 后切换为 1~6 连接,将目标物引入质谱仪。

2.3 质谱条件 采用 ESI 电喷雾离子源,负离子模式采集,全扫描模式,扫描范围 m/z 95~200,分辨率 100 000,鞘气 40 arb,辅助气 8 arb,吹扫 0 arb,电喷雾电压 4 kV,加热毛细管温度 350 °C,毛细管电压 -31 V,透镜电压 -53 V。

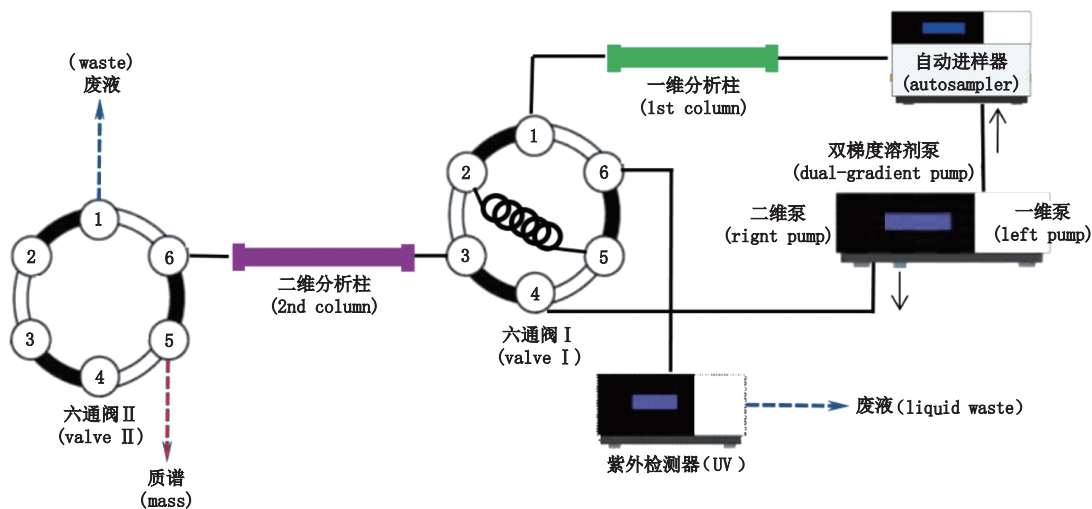


图1 在线二维色谱系统工作原理示意图

Fig.1 The on-line two-dimensional HPLC/MS working principle

3 溶液的配制

3.1 门冬氨酸对照品溶液

精密称取门冬氨酸对照品适量,加水稀释制成 $1.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

3.2 富马酸对照品溶液

精密称取富马酸对照品适量,加水稀释制成 $15 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

3.3 含量测定用供试品溶液

精密量取本品 1.0 mL ,置 50 mL 的量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

3.4 有关物质测定用供试品溶液

精密量取本品 1.0 mL ,置 5 mL 的量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

3.5 有关物质溶液

精密量取有关物质测定用供试品溶液 1.0 mL ,置 100 mL 的量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得有关物质对照溶液。

4 专属性试验^[12]

4.1 强制降解试验

精密量取本品 10 mL ,置 50 mL 量瓶中,分别加 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 10 mL , $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 10 mL ,置水浴 ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) 中放置 6 h ;加 30% 双氧水溶液 10 mL ,置水浴 ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) 中放置 2 h ;在 $4\ 500 \text{ lx}$ 光照条件下放置 24 h ;在 $90 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 12 h ;并时时振摇,放冷,加水稀释至刻度(酸碱破坏样品先分别中和),按“2.1”项下色谱条件进行测定。在上述色谱条件下,门冬氨酸峰与酸、碱、氧、光和热

破坏产生的降解产物峰能很好分离,结果见图2。

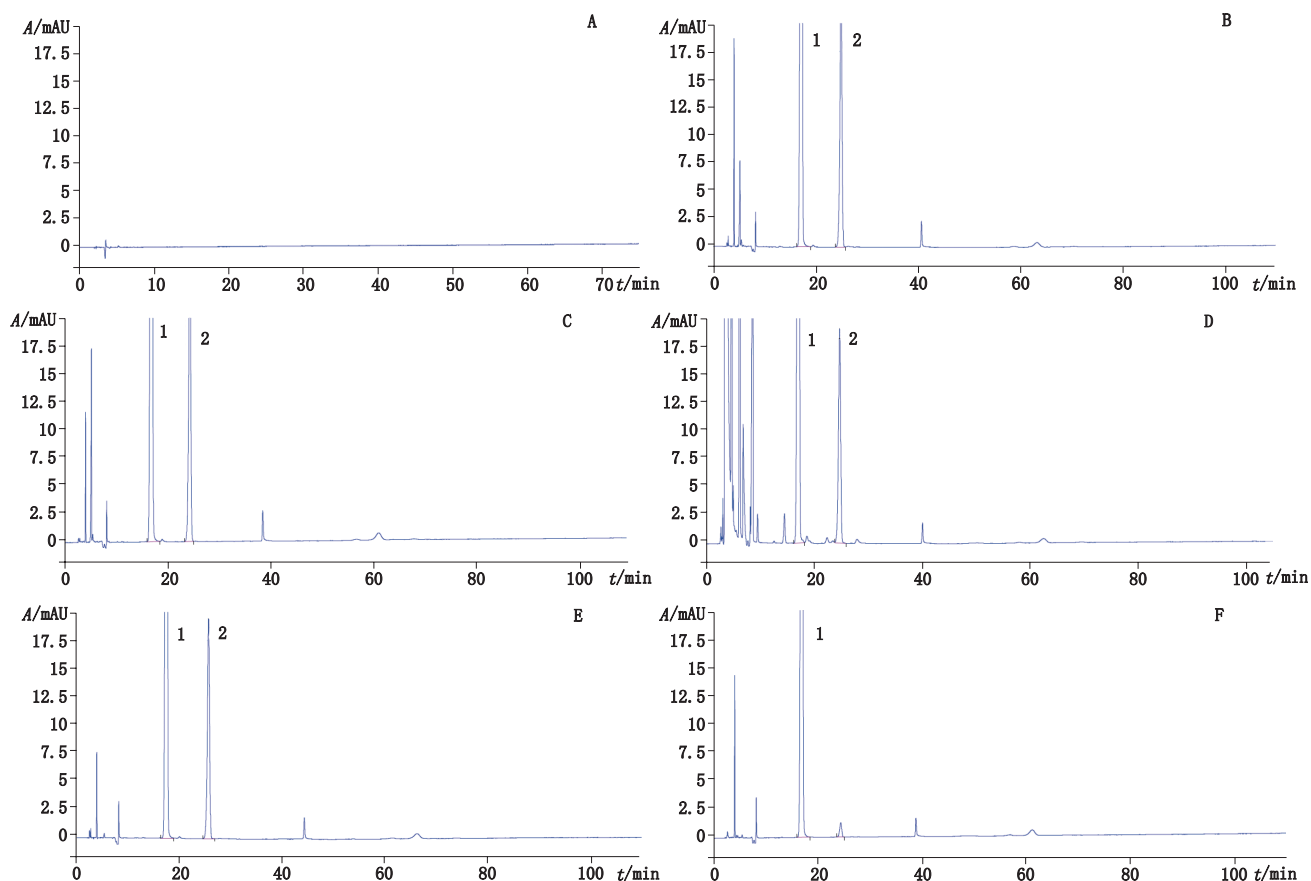
4.2 方法专属性试验 取溶剂水,依法测定,按“2.1项”下的色谱条件进行测定,见图2。结果表明,空白溶剂不干扰有关物质测定。

4.3 最大单个杂质的定性研究^[13-14]

利用建立的 HPLC 法对门冬氨酸钾镁注射液进行有关物质考察,结果发现在同一位置稳定出现最大单个杂质,故首先采用线二维脱盐技术对最大单个杂质进行 HPLC-MS 的分子量和分子式的研究,再采用 HPLC 对可能的杂质的保留时间进行比较。

4.3.1 HPLC-MS 对最大单个杂质进行分子量和分子式的研究 “2.1项”下色谱条件的流动相中含磷酸盐,而磷酸盐无法进入质谱系统,故采用在线二维脱盐技术,对门冬氨酸钾镁注射剂中最大单个杂质进行质谱分析。采用“2.2”项下基于“中心切割”法的在线二维脱盐技术,利用切换阀将最大单个杂质色谱峰转入第二维色谱柱,再利用挥发性缓冲盐将目标物洗脱至质谱并进行分析,磷酸盐切入废液。采用“2.3”项下的质谱条件,获得最大单个杂质质谱图,见图3。结果可知,供试品溶液中最大单个杂质的相对分子质量为 $115.002\ 82$,由高分辨质谱的分子量信息推断其分子式为 $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ (偏差为 2.029×10^{-6}),结合合成工艺,推断该物质可能为富马酸。

4.3.2 HPLC 法对单个最大杂质进行初步定性研究 精密量取“3”项下的对照品溶液和有关物质供试品溶液各 $5 \text{ } \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果表明,门冬氨酸对照品、门冬



1. 门冬氨酸 (aspartate) 2. 富马酸 (fumaric acid)

A. 空白溶液 (blank solution) B. 酸破坏 (acidic degradation) C. 碱破坏 (basic degradation) D. 氧化破坏 (H_2O_2 degradation) E. 光破坏 (light degradation) F. 热破坏 (heat degradation)

图2 专属性考察图谱

Fig. 2 Specificity chromatogram

氨酸钾镁注射液的主峰的出峰时间分别为 16.899 和 16.849 5 min, 出峰时间基本一致; 富马酸对照品、门冬氨酸钾镁注射液中最大单个杂质的出峰时间分别为 24.212 和 24.207 min, 出峰时间也基本一致, 故可初步判断最大单个杂质为富马酸 (分子式 $C_4H_4O_4$)。

4.3.3 最大单个杂质的结构初步确认 结合门冬氨酸的合成工艺、HPLC 法的出峰时间以及高分辨质谱推断的相对分子质量和分子式的信息, 可推断门冬氨酸钾镁注射剂中的最大单个杂质为富马酸。

5 定量下限与检测下限

取“3”项下的门冬氨酸对照品溶液逐级稀释, 门冬氨酸的定量下限和检测下限分别为 60.8 ng 和 23.5 ng, 其 S/N 分别为 10.3 和 3.8。

取“3”项下的富马酸对照品溶液逐级稀释, 富马酸的定量下限和检测下限分别为 0.152 ng 和

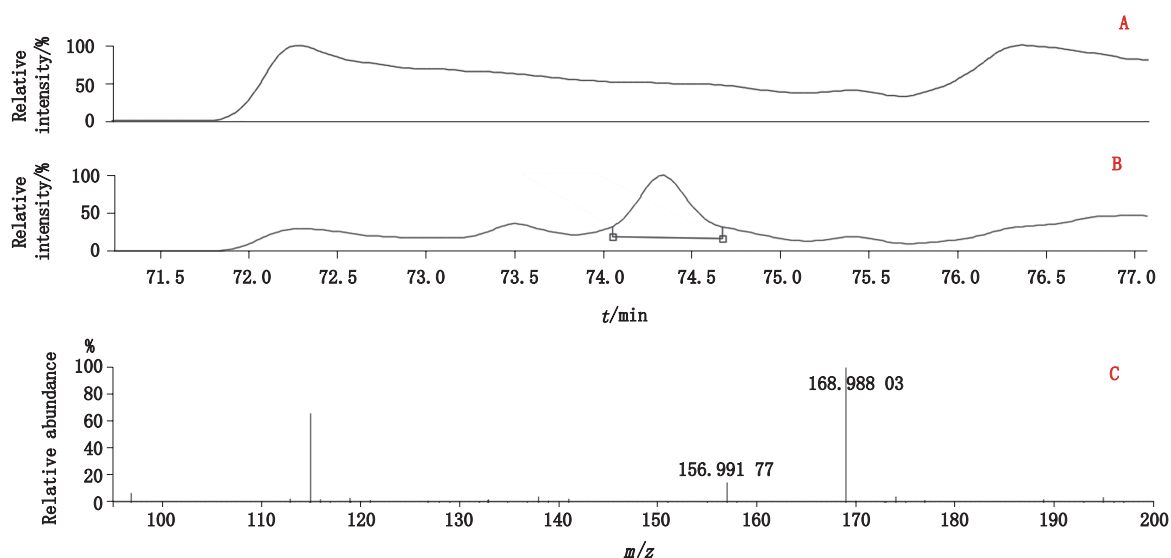
0.051 ng, 其 S/N 分别为 10.2 和 3.1。

6 线性关系试验

精密称取门冬氨酸对照品 169.32 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1.0、2.5、5.0、7.5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为门冬氨酸线性溶液。

精密称取富马酸对照品 10.18 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 用水溶解并定容, 摇匀, 作为富马酸对照品储备液。精密量取富马酸对照品储备液 1.0、2.0、5.0、7.5、10.0、20.0 mL, 分别置 6 个 100 mL 量瓶中, 再精密量取富马酸对照品储备液 20.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 分别用水稀释至刻度, 摇匀, 作为富马酸线性溶液。

精密量取上述溶液各 5 μ L, 按“2.1”项下色谱条件, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 分别得门冬氨酸和富马酸回归方程:



A. 总离子流图 (TIC) B. 提取离子流 (EI, $m/z=115$) C. 目标物质谱图 (MS of target, $t_R=74.34$)

图3 最大单个杂质质谱图

Fig. 3 MS chromatogram of the maximum single impurity

$$A=313.9C+10.84 \quad r=0.9998$$

$$A=1.732 \times 10^5 C-1.12 \quad r=0.9999$$

试验结果表明,门冬氨酸浓度在 $0.33864 \sim 3.3864 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,富马酸浓度在 $2.032 \sim 81.277 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内时,峰面积与浓度线性关系良好。

7 精密度试验

取“6”项下门冬氨酸线性溶液3 ($1.6932 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)与富马酸线性溶液4 ($15.239 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),按“2.1”项下的色谱条件,连续进样6次,门冬氨酸与富马酸的RSD分别为0.23%和0.32%。

8 重复性试验

照“3”项下方法制备含量测定和有关物质测定用供试品溶液6份,按照“2.1”项下的色谱条件进样分析,门冬氨酸含量的RSD为0.29%,有关物质测定中富马酸、最大单个杂质与其他总杂的RSD分别为1.6%、0.75%和0.48%。

9 稳定性试验

照“3”项下方法制备含量测定和有关物质测定用供试品溶液,按照“2.1”项下的色谱条件,分别于0、1、2、4、6、8、12和24h进样分析,门冬氨酸含量的RSD为0.46%,有关物质测定中富马酸、单个最大杂质与总杂质含量的RSD分别为0.87%、0.07%和1.0%。

10 回收率考察

分别精密称取门冬氨酸对照品约13.6、17、20.4mg各3份,分别置100mL量瓶中,再加入处方量的

氢氧化钾和氧化镁,加水使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;另取“6”项下的门冬氨酸线性溶液3作为对照品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件测定,计算回收率。结果低、中、高3种浓度的平均回收率分别为99.7%、99.2%和99.8%。

精密量取本品0.5mL,共6份,分别置5mL的量瓶中,分别加入“6”项下的富马酸线性溶液6 ($40.639 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)0.7mL,再加水稀释至刻度,摇匀,即得6份回收率试验供试品溶液。取“6”项下的富马酸线性溶液4作为对照品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件测定,计算回收率。结果6份样品的平均回收率为99.6%,RSD为0.81%。

11 耐用性考察

照“3”项下的方法制备含量测定和有关物质测定用供试品溶液,保持“2.1”项下色谱条件不变,分别采用Waters Spherisorb NH_2 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$)、Ultimate XB- NH_2 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$)测定样品的含量和有关物质,结果见表2,表明方法耐用性好。

12 含量测定

取本品,按“3”项下方法制备供试品和对照品溶液,按“2.1”项下方法测定,含门冬氨酸 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$)均应为标示量的93.0%~107.0%。各批样品中门冬氨酸含量见表3,结果均符合规定。

表 2 耐用性试验结果

Tab. 2 Result of robustness test

色谱柱 (column)	批号 (lot No.)	含量 (content)/%	有关物质 (related substance) /%		
			富马酸 (fumaric acid)	最大单个杂质 (largest single impurity)	其他 (other impurities)
Waters Spherisorb- NH ₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1412156321	100.16	0.09	0.69	1.69
Ultimate XB-NH ₂ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	1412156321	100.47	0.09	0.69	1.70

表 3 门冬氨酸钾镁含量和有关物质测定结果 (n=2, %)

Tab. 3 Results of contents and related substances of potassium aspartate and magnesium aspartate injection

生产厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	含量 (content) /%	有关物质 (related substance) /%		
			富马酸 (fumaric acid)	最大单个杂质 (largest single impurity)	其他 (other impurities)
1	1408216311	99.42	0.11	0.62	2.11
	1412156321	100.41	0.09	0.69	1.69
	1506266311	101.88	0.09	0.76	1.85
2	1503064	102.75	0.09	0.63	1.77
	1503181	100.78	0.07	0.66	1.75
	1503171	99.08	0.07	0.67	1.71
3	150107F1	99.12	0.04	0.67	1.54
	150111F1	99.91	0.04	0.72	1.63
	140608F1	96.91	0.04	0.73	1.66

13 有关物质

取本品,按“3”项下方法制备供试品溶液、对照品溶液、富马酸对照品溶液,按“2.1”项下方法测定,精密量取供试品溶液、富马酸对照品溶液和对照溶液各 5 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 5 倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,按外标法以峰面积计算,含富马酸不得过门冬氨酸标示量的 0.20%,其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液中门冬氨酸主峰面积 (1.0%),其他各杂质峰面积的和不得大于对照溶液中门冬氨酸主峰面积的 2.0 倍 (2.0%)。样品测定结果见表 3,结果均符合

规定。

14 讨论

14.1 柱切换在线二维脱盐液质联用技术

柱切换技术在生物样品和药物分析应用较为广泛,柱切换在线二维脱盐液质联用技术^[15]应用却较少,本方法在一维色谱柱完成被测组分与最大单个杂质的分离,达到对最大单个杂质的纯化与富集的目的,在二维色谱柱上串联质谱对最大单个杂质进行定性分析。液相色谱仪配置了双三元泵:样品现有右泵含非挥发性缓冲盐(磷酸二氢钾)流动相经过一维分析柱,再经过六通阀切换到二维分析柱,二维分析

柱,的流动相是左泵,含挥发性缓冲盐(醋酸铵)流动相,经过二维分析柱后,再流进 Thermo LTQ Orbitrap 高分辨质谱仪,从而初步判定最大单个杂质的结构和性质。

14.2 检测波长的确定

采用 UV 分光光度计对门冬氨酸对照品溶液(0.4 mg·mL⁻¹)和门冬氨酸钾镁注射液(含门冬氨酸 0.4 mg·mL⁻¹)、溶剂水和流动相[乙腈-0.05 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾(60:40)]在 200~400 nm 波长范围内进行全波长扫描。结果表明,门冬氨酸对照品和门冬氨酸钾镁注射液均只有末端吸收,溶剂水和流动相[乙腈-0.05 mol·L⁻¹的磷酸二氢钾(50:50)]不干扰紫外测定,在 210 nm 处灵敏度较高,且有关物质均有一定吸收,故选取 210 nm 作为检测波长。

14.3 流动相的选择

实验考察了 C₁₈ 柱对检测结果的影响,流动相为乙腈-30 mmol·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠(0.1% 三乙胺,磷酸调 pH 至 2.5)(15:85)^[16],门冬氨酸的峰形差,峰宽且拖尾严重,与周围杂质峰的分度差。将水相的 pH 降低至 2.3,峰形稍微改善,但与周围杂质峰的分度仍不理想。改用氨基柱,采用乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(60:40)为流动相,门冬氨酸与相邻杂质峰的分度大于 1.5,且峰形较好,同时考察不同流动相比比例对检测结果的影响,随着水相比比例的提高,主峰出峰时间提前,可节省有关物质分析时间,但由于氨基柱对水相耐受比例的制约,最终选择乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(60:40)。

14.4 系统适用性

本实验在拟定的流动相和检测波长等色谱条件下,先后对不同品牌的氨基柱进行了耐用性试验,结果表明,不同品牌的氨基柱检测结果基本一致。但随着氨基柱使用时间的延长,门冬氨酸和富马酸的出峰时间均会提前,且两者的分度会下降,当两者的分度小于 4 时,门冬氨酸主峰与相邻杂质峰的分度可能小于 1.5,故将系统适用性条件拟定为门冬氨酸和富马酸峰之间的分度应大于 4.0。

14.5 进样量的确定

本品为水溶液,在本色谱条件中属于强溶剂,加之氨基柱对水的耐受有限,过大的进样量会影响氨基柱的寿命。本实验在拟定的流动相和检测波长等色谱条件下,选择 5、10、20 μL 作为进样量,结果发现随着进样量的提高,主峰的峰形变差且色谱柱的使用

寿命也随之下降,最终选择 5 μL 作为进样量。

14.6 流速的选择

采用乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(60:40)为流动相,改变流速(0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹),有关物质峰与主峰均可完全分离,考虑流速对组分分离、保留时间以及对色谱柱和液相系统压力的影响,选择流速 1.0 mL·min⁻¹。

14.7 强制降解试验

该品种对光较稳定,对热、氧化比较敏感,能被酸及碱破坏,所产生的降解产物在该色谱条件下能与主峰有效地分离。由于降解产物均在主峰的 4 倍保留时间内出峰,故有关物质检查记录时间定为主峰保留时间的 5 倍。

14.8 最大单个杂质的推断

本次国家药品抽检计划共抽取门冬氨酸钾镁注射液 157 批,分别来自 19 家不同的生产企业,所有产品中富马酸均为最大单个杂质,故可以推断富马酸作为最大单个杂质是这类产品的共性。根据生产企业所提供的门冬氨酸合成工艺:富马酸+酶液→溶解→酶反应→脱色→过滤→调酸→沉淀→离心→湿品 L-门冬氨酸→干燥→包装→成品 L-门冬氨酸,初步判断有关物质中的最大单个杂质可能为来源于门冬氨酸合成过程中残留的起始原料富马酸。同时,在强制降解试验中发现,对本品进行酸、碱、氧化和热破坏时,富马酸的含量也在增加,提示不仅需要对本品的原料门冬氨酸中的富马酸进行控制,同时也需要控制本品在生产和贮存过程中产生富马酸,故在本品的有关物质中单独对富马酸进行测定,可有效控制产品质量。

氨基酸一般采用柱前或柱后衍生的方法进行含量测定,与常规的氨基酸测定方法比较,本文所建立的 HPLC 法,不仅可以测定本品中所含门冬氨酸的含量,还可以同时对本品的有关物质进行测定,并对单个最大杂质富马酸进行定性和定量研究,具有方法快速简便,灵敏度高,选择性好的特点,可用于门冬氨酸钾镁注射液的质量控制。

参考文献

- [1] 李金成,张绍媚,何杰梅. 国产和进口门冬氨酸钾镁制剂补钾的疗效比较[J]. 中国药业, 2015, 24(7): 95
LI JC, ZHANG SM, HE JM. Comparison of effect of potassium by domestic and imported nmda potassium magnesium preparations[J]. China Pharm, 2015, 24(7): 95
- [2] 肖菁,王蓉蓉,李盼盼,等. 离子色谱法测定门冬氨酸钾镁注射液

- 中钾、镁和钠离子含量[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(24): 2144
- XIAO J, WANG RR, LI PP, *et al.* Determination of potassium, magnesium and sodium ion in potassium aspartate and magnesium aspartate injection by ion chromatography[J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2016, 36(24): 2144
- [3] 魏文峰, 于艳彬, 邱伟兰, 等. 黄芪联合门冬氨酸钾镁治疗妊娠合并病毒性心肌炎临床研究[J]. 临床合理用药, 2011, 4(3C): 8
- WEI WF, YU YB, QIU WL, *et al.* Clinical observation of the treatment of astragalus united potassium-magnesium aspartate for viral myocarditis during pregnancy[J]. *Clin Ration Drug Use*, 2011, 4(3C): 8
- [4] 何娟, 沈浓儿, 胡维杰. 门冬氨酸钾镁辅助治疗室性早搏疗效观察[J]. 中国药师, 2016, 19(7): 1319
- HE J, SHEN NE, HU WJ. Efficacy observation of potassium magnesium aspartate in the auxiliary treatment of ventricular premature beat[J]. *China Pharm*, 2016, 19(7): 1319
- [5] 牛美芝, 解静, 刘宁, 等. 门冬氨酸钾镁联合胺碘酮对慢性心力衰竭并室性心律失常患者心功能的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2017, 20(4): 1672
- NIU MZ, XIE J, LIU N, *et al.* Effects of potassium magnesium aspartate combined amiodarone on cardiac function of chronic heart failure with ventricular arrhythmia patients[J]. *Chin J Clin Health*, 2017, 20(4): 1672
- [6] 卫生部药品标准二部第五册[S]. 1996:8
- Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health. P. R China Part2. Vol 5[S]. 1996: 8
- [7] 高春, 戴红, 姚瑛, 等. 门冬氨酸钾镁葡萄糖注射液中 L- 门冬氨酸的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(5): 244
- GAO C, DAI H, YAO Y, *et al.* Determination of aspartic acid in potassium magnesium aspartate and glucose injection by HPLC[J]. *Chin J Pharm*, 2003, 34(5): 244
- [8] FISHER GH, TSESARSKAIA M. HPLC methods for determination of D-aspartate and N-methyl-D-aspartate[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 794: 253
- [9] MORA R, BERNDT KD, TSAI H, *et al.* Quantitation of aspartate and glutamate in HPLC analysis of phenylthiocarbonyl amino acids[J]. *Anal Biochem*, 1988, 172(2): 368
- [10] 杨美琴, 金少鸿, 胡昌勤. HPLC- 柱切换法归属青霉素钠有关物质中的聚合物分析[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1615
- YANG MQ, JIN SH, HU CQ. Analysis of polymer impurities in related substances of benzylpenicillin sodium by HPLC-column-switching[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(10): 1615
- [11] 周长明, 丁锐. 柱切换柱后衍生高效液相色谱法测定前列地尔注射液主药的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 402
- ZHOU CM, DING R. Determination of the content of alprostadil injection by HPLC post-column derivatization and column switching[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(3): 402
- [12] 蒋秋玲, 石金芳, 狄斌, 等. LC-MS/MS 法分析注射用头孢西丁钠中的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1597
- JIANG QL, SHI JF, DI B, *et al.* Identification of the related substances in cefoxitin sodium for injection by LC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(9): 1597
- [13] 陈斌, 郁颖佳, 段昊天, 等. 4 种门冬氨酸钾镁注射液的质量及生产工艺研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(5): 336
- CHEN B, YU YJ, DUAN HT, *et al.* Quality and production technique analysis of four kinds of potassium aspartate magnesium aspartate for injection[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2008, 27(5): 336
- [14] ULRIKE H, CEES-JAN N, STEFAN A. Control of impurities in L-aspartic acid and L-alanine by high-performance liquid chromatography coupled with a corona charged aerosol detector[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 294
- [15] 刘珊, 陈悦, 洪利姬, 等. 柱切换在线除盐 DGLC-MS 联用鉴定克林霉素磷酸酯中杂质[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(9): 669
- LIU S, CHEN Y, HONG LJ, *et al.* Identification of impurities in clindamycin phosphate by column-switching and online demineralization technique for dual gradient liquid chromatography combined with mass spectrometry[J]. *Chin J Antibiot*, 2014, 39(9): 669
- [16] 徐三能, 张静. HPLC 法测定门冬氨酸钾镁注射液中门冬氨酸的含量[J]. 安徽医药, 2014, 18(8): 1443
- XU SN, ZHANG J. Determination of aspartic acid in potassium magnesium aspartate injection by HPLC[J]. *Anhui Med Pharm J*, 2014, 18(8): 1443

(本文于 2017 年 3 月 20 日收到)