

柱前衍生-高效液相色谱串联高分辨质谱法检测 谷氨酸钠注射液中谷氨酸钠的含量

隋红霞¹ 王培旭²

(¹ 天津市河西区东海街社区卫生服务中心,天津 300222;² 烟台山医院药剂科,烟台 264000)

摘要 目的 建立基于超高效液相色谱串联高分辨质谱法测定谷氨酸钠注射液中谷氨酸钠含量的高灵敏和高选择性新方法。方法 色谱柱为 Kinetex C18(2.0×100mm,1.7μm),流动相为 0.1% 甲酸水和甲醇溶液,样本中谷氨酸以 3-溴丙基三苯基磷(3-BMP)进行衍生化反应,流速为 0.40μL/min,谷氨酸衍生化物母离子和特征碎片分别为 450.18→320.16。使用非数据依赖型扫描模式绘制标准曲线。结果 谷氨酸钠在 0.024~1000pmol 范围线性关系良好($R^2=0.9999$),最低检出量为 4.00fmol,最低定量限为 24.25fmol,平均加标回收率为 91.71%,日内日间精密度 RSD 分别为 1.67%~2.64%和 1.66%~4.55%。结论 该方法简便、灵敏、准确,样品处理简单,适用于产品质量检测和实验室中测定谷氨酸钠注射液中谷氨酸钠的含量。

关键词 谷氨酸钠注射液;谷氨酸;柱前衍生化;高效液相色谱串联高分辨质谱法

中图分类号:R3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2023)12-416-04

Determination of sodium glutamate in sodium glutamate injection by precolumn derivatization-high performance liquid chromatography-electrochemical method

SUI Hongxia¹, WANG Peixu²

(¹ Tianjin Hexi District Donghai Street Community Health Service Center, Tianjin 300222, China;

² Department of Pharmacy, Yantai Mountain Hospital, Yantai 264000, China)

Abstract: Objective To establish an ultra performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry for the determination of sodium glutamate in sodium glutamate injection. **Methods** Kinetex C18 (2.0×100mm,1.7μm) was used as the chromatographic column, and the mobile phase was 0.1% formic acid water and methanol solution. In the sample, glutamic acid was derivatized with 3-bromopropyl triphenylphosphorus (3-BMP) at a flow rate of 0.40L/min, and the parent ions and characteristic fragments of glutamic acid derivatives were 450.18→320.16, respectively. Draw standard curves using data-independent scanning mode. **Results** The linear relationship of sodium glutamate was good in the range of 0.024~1000pmol ($R^2=0.9999$), the minimum detection limit was 4.00fmol, the minimum quantitative limit was 24.25fmol, the average recovery rate was 91.71%, and the RSD of intra-day and inter-day precision were 1.67%~2.64% and 1.66%~4.55% respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive and accurate, and the sample processing is simple. It is suitable for product quality inspection and laboratory determination of sodium glutamate in sodium glutamate injection.

Keywords: Injection of sodium glutamate; Glutamate; Pre-column derivation; High performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry

氨基酸是含有氨基和羧基的一类有机化合物的通称,氨基酸的分析技术对蛋白质化学、生物化学和整个生命科学研究以及产品开发、质量控制和生产管理等具有重要意义^[1-2]。一方面谷氨酸钠注射液是一种用于治疗代谢性酸中毒、电解质紊乱、

肝性脑病的药物,内含谷氨酸钠,因其无发色基团且极性较大为高灵敏度和高选择的分析带巨大来挑战^[3-4]。另一方面,谷氨酸钠含量的准确测定对于药品的质量控制和使用效果的评价以及不良反应的控制具有重要的意义^[5],因此,谷氨酸钠注射

液中谷氨酸钠含量的准确测定是药品质量控制和用药效果评价的关键步骤。

由于谷氨酸无发色基团且极性较大,难以在 C18 色谱柱保留,无法直接测定,需要采用衍生化反应将其转化成易电离物质进行间接测定^[2]。高效液相色谱是分析化学中发展最快,应用最广的领域之一,具有操作方便、准确度高、特异性强等特性^[6],使其成为临床化学、生物学和毒物学等领域中有效分离和质量监控手段^[7-8]。质谱检测具有选择性好,检测限低,较高的灵敏度,线性范围宽,结构简单,成本低廉,无放射,无污染等优点^[9-10]。本研究采用柱前衍生化技术结合高效液相色谱串联高分辨质谱检测法测定谷氨酸钠注射液中谷氨酸钠的含量,为准确测定谷氨酸钠注射液中谷氨酸钠的含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 超高效液相串联高分辨质谱仪 Triple TOF 5600+ (AB Sciex 公司,美国), Kinetex C18 (2.0×100mm, 1.7μm) 色谱柱 (Waters 公司,美国), YY91001-1999 型全玻璃注射器 (金坛市第二注射器厂制造), H00005 型超声清洗机 (无锡超声电子设备厂), 抽滤设备 (HENGGAO T&D 公司,中国), 混合纤维素酯微孔滤膜 (北京化工学校附属工厂), 2D-2 型自动电位滴定计 (上海第二分析仪器厂), BT125D 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.1.2 试剂 谷氨酸 (Glutamic acid, Glu, C₅H₉NO₄, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: B2216322), 6-氨基己酸 (6-Aminocaproic acid, IS, C₆H₁₃NO₂, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: RH431250), 谷氨酸钠注射液 (上海旭东海普药业有限公司), 3-溴丙基三苯基磷 (3-BMP, C₂₁H₂₁BrP, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: K2108775), 三乙胺 (色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂, 批号: 20211126), 实验用水均为重蒸水。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制 1) 对照品溶液的配制。参照以下方法配制 0.1mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、1.5mg/mL、2mg/mL 的对照品溶液: 称取 0.0200g 谷氨酸, 放入 10mL 容量瓶中, 用重蒸水溶解定容, 配制成 2mg/mL 的溶液; 称取 0.0100g 谷氨酸对照

品, 放入 10mL 容量瓶中, 用重蒸水溶解定容, 配制成 1mg/mL 的溶液; 取此溶液 1mL 放入 10mL 的容量瓶中, 用重蒸水定容, 配制成 0.1mg/mL 的标准溶液; 取 0.0050g 谷氨酸, 放入 10mL 容量瓶中, 用重蒸水溶解定容, 配制成 0.5mg/mL 的溶液; 称取 0.0150g 谷氨酸, 放入 10mL 容量瓶中, 用重蒸水溶解定容, 配制成 1.5mg/mL 的溶液。

2) 供试品溶液的配制。精密量取待测谷氨酸钠注射液 1.0mL 用重蒸水溶解定容至 1000mL, 溶解, 待测。

1.2.2 样品衍生化反应 现有的氨基酸一般常使用 3-BMP 作为衍生化试剂, 用 5% 三乙胺提供氨基酸与 3-BMP 衍生物提供反应所需的碱性条件。

精密称取 0.0040g 3-BMP, 加入 1mL 乙腈和水溶液, 超声溶解, 即得衍生化试剂。将其放入冰箱中冷藏, 避光保存。

取 300μL 谷氨酸和 50μL 内标工作液于聚乙烯管内, 加 50μL 衍生化试剂, 60℃ 下反应 30min 即可完成衍生化, 用于后续测定。

1.2.3 色谱条件 色谱和质谱条件: 色谱柱为反相色谱柱 Kinetex C18 (2.0×100mm, 1.7μm), 流动相的组成为 0.1% 甲酸水和甲醇溶液, 进样量为 1μL, 流速为 0.40μL/min, 使用非数据依赖模式扫描谷氨酸衍生物母离子和特征碎片分别为 450.18→320.16。

1.2.4 流动相和检测条件的选择 分别量取 0.1% 甲酸溶于水 and 甲醇溶液中作为流动相 A 和 B, 在 0~5~20min 内使用 10%~19%~19% 的流动相 B 的梯度测定谷氨酸标准溶液, 观察测定的灵敏度和峰形。

1.2.5 标准曲线的建立 由配制的一系列对照品溶液 (0.1mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、1.5mg/mL、2mg/mL), 依次与 3-BMP 进行衍生化反应后, 分别取一定量, 按照 1.2.3 方法进样分析, 测定峰面积, 以谷氨酸的峰面积对其浓度作图, 计算回归方程 ($Y = bx + a$), 即为谷氨酸的标准曲线。

1.2.6 重复性试验 取 1.2.1 中配置好的 1mg/mL 的对照品溶液, 与 3-BMP 进行衍生化反应后, 重复进样 9 次, 按照 1.2.3 方法进样分析, 测定峰面积, 计算 9 次进样的相对标准偏差。

1.2.7 回收率试验 为了使未加标的样品与加标的样品稀释相同的倍数, 在样品中加入同体积的流动相, 即将 300μL 供试品溶液和 300μL 的 1mg/mL

谷氨酸对照品溶液混合,经衍生化后,取 20 μ L 混合液进样。同理将 300 μ L 供试品溶液和 300 μ L 的流动相混合,经衍生化后,取 20 μ L 混合液进样。再将 300 μ L 的 1mg/mL 谷氨酸对照品溶液与 300 μ L 流动相混合,经衍生化后,取 20 μ L 混合液进样。重复 5 次,得到回收率数据,对 5 个回收率进行相对标准差的计算。

1.2.8 最低检测限和最低定量限测定 在本实验条件下,由 1mg/mL 谷氨酸对照品溶液逐级稀释,采用 1.2.3 方法进行进样分析,测定进样浓度下的信噪比(S/N),当 S/N=3 时的对照品溶液中谷氨酸的浓度即为最低检测量,当 S/N=10 时的对照品溶液中谷氨酸的浓度即为最低定量限。

2 结果与讨论

2.1 衍生化条件的优化

使用 3-BMP 标记 Glu 的具体过程如图 1 所示。图 2 表明谷氨酸衍生物的母离子和靶向标记氨基官能团的特征碎片 450.18 $\rightarrow$ 320.16。而后通过非数据依赖型扫描模式检测谷氨酸,结果如图 3 所示,谷氨酸在 12.85min 溶出。而后通过考察谷氨酸衍生物峰面积,图 4 表明随着反应时间的延长逐渐增大并在 100min 时趋于平稳,200min 时保持不变,因此,当在 60 $^{\circ}$ C 下衍生 100min 时,标记效率最高。

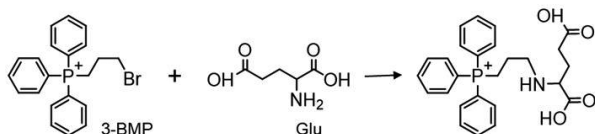


图 1 谷氨酸与 3-BMP 的衍生化反应及化学结构

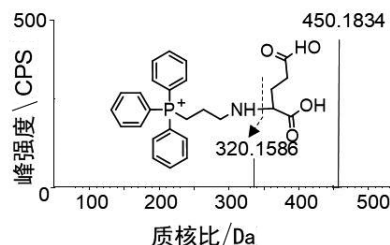


图 2 谷氨酸衍生物的特征碎片

2.2 标准曲线的建立

分别配制 0.024~1000pmol 的对照品溶液,依次进样记录峰面积。以谷氨酸峰面积为纵坐标,对应浓度为横坐标,绘制标准曲线,如图 3 所示,以谷

氨酸的浓度对其峰面积进行线性回归,得回归方程为: $y=0.0007x+0.003$,相关系数 $R^2=0.9999$,即在 0.024~1000pmol 范围内呈现良好的线性关系。

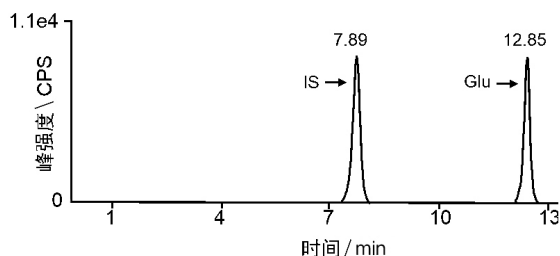


图 3 谷氨酸衍生物的 UHPLC-HRMS 色谱图

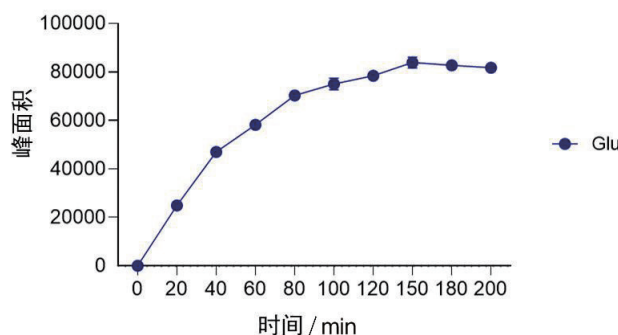


图 4 60 $^{\circ}$ C 下 3-BMP 标记谷氨酸反应时间进程

表 1 谷氨酸衍生物工作曲线和检测限

分析对象	线性范围 /pmol	线性方程	变异系数 (n=3)	相关系数 (R^2)	检出限 /fmol	定量限 /fmol
谷氨酸	0.024~1000	$y=0.0007x+0.003$	0.54~4.66	0.9999	4.00	24.25

2.3 重复性

取低中高 3 个浓度的谷氨酸对照品溶液,重复进样 9 次,分析操作重复性(结果如表 3 所示)。在进样量相同时,各个峰面积大小接近,日内日间 RSD 为 2.19%~3.04% 和 1.05%~3.97%,表明该方法的重复性良好,可满足对供试品的测定需求。

表 2 通过日内和日间分析确定
建议方法的准确度和精密度

分析物	加标量 / μ M	日内精密性(n=6)			日间精密性(n=6)		
		平均值 / μ M	相对标准偏差/%	准确度 /%	平均值 / μ M	相对标准偏差/%	准确度 /%
谷氨酸	7.81	7.83	2.19	100.26	7.92	1.05	99.37
	31.25	32.31	3.06	103.40	31.62	2.86	101.18
	62.50	62.76	2.34	100.42	62.10	3.97	101.31

2.4 回收率实验

按照 1.2.7 方法检测方法的准确性,结果见表 3,下表中样品中谷氨酸的回收率为 86.15%~

97.55%,平均回收率为 91.71%,RSD 为 1.67%~2.64%,表明该方法可准确测定谷氨酸的含量,可用于谷氨酸钠注射液中的样品浓度测定。

表 3 谷氨酸测定的回收率实验

分析物	加标量	回收量 ($\mu\text{M}, \bar{x} \pm s$)	日间精 密度/%	日内精 密度/%	添加回 收率/%	平均回 收率/%
谷氨酸	0	16.16	4.55	2.64	-	91.71
	7.81	23.86 $\pm$ 0.91	3.99	1.67	97.75	
	31.25	44.81 $\pm$ 1.15	1.88	2.62	91.42	
	62.50	70.09 $\pm$ 1.13	1.66	2.22	86.15	

2.5 最低检测限

在本实验条件下,由 1mmol/L 谷氨酸对照品溶液逐级稀释至 4fmol 时,信噪比为 3,即方法的最低检测量为 4.00fmol;当谷氨酸对照品溶液浓度为 24.25fmol 时,信噪比为 10,即该方法的最低定量限为 24.25fmol。说明该方法的灵敏度高,可满足检测需求。

3 结论

选用色谱柱为 Kinetex C18 (2.0 $\times$ 100mm, 1.7 μm),流动相为 0.1%甲酸水和甲醇溶液,样本中谷氨酸以 3-溴丙基三苯基磷(3-BMP)进行衍生化反应,流速为 0.40 $\mu\text{L}/\text{min}$,谷氨酸衍生化物母离子和特征碎片分别为 450.18 $\rightarrow$ 320.16 等实验条件,能较好地检测出样品中谷氨酸的含量。

该方法线性范围宽,灵敏度高,准确度高,可应用到临床研究中,检测患者血浆中氨基酸的含量,作为阻塞性心血管疾病危险的早期诊断辅助指标,为患者临床用药方案的制定提供参考,也可用于谷氨酸钠注射液中谷氨酸的含量检验工作中,为药品有效成分含量检验具有非常重要的作用。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

[1] Raimbault A, Noireau A, West C. Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry-application to food supplements [J]. J Chromatogr A, 2020, 1616: 460772. DOI: 10. 1016/j. chroma. 2019. 460772.

[2] Rueda AA, Jurado JM, de Pablos F, et al. Differentiation between Ripening Stages of Iberian Dry-Cured Ham Ac-

cording to the Free Amino Acids Content [J]. Foods, 2020, 9(1): 82. DOI: 10. 3390/foods9010082.

[3] Hu Z, Guan W, Wang W, et al. Protective effect of a novel cystine C(60) derivative on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. Chem Biol Interact, 2007, 167(2): 135-144. DOI: 10. 1016/j. cbi. 2007. 02. 009.

[4] Nelson AD, Camilleri M, Chirapongsathorn S, et al. Comparison of efficacy of pharmacological treatments for chronic idiopathic constipation: a systematic review and network meta-analysis [J]. Gut, 2017, 66(9): 1611-1622. DOI: 10. 1136/gutjnl-2016-311835.

[5] Kamal AH, El-Malla SF, Elattar RH, et al. Determination of monosodium glutamate in noodles using a simple spectrofluorometric method based on an emission turn-on approach [J]. J Fluoresc, 2023, 33(4): 1337-1346. DOI: 10. 1007/s10895-023-03143-0.

[6] Sarotra P, Dutta U, Gupta H, et al. Simultaneous determination of lactulose, sucrose, sucralose, and mannitol using high-performance liquid chromatography-refractive index to estimate intestinal permeability in patients with active ulcerative colitis [J]. Indian J Pharmacol, 2022, 54(4): 270-277. DOI: 10. 4103/ijp. ijp_90_22.

[7] Zhao P, Zhao J, Lei S, et al. Simultaneous enantiomeric analysis of eight pesticides in soils and river sediments by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chemosphere, 2018, 204: 210-219. DOI: 10. 1016/j. chemosphere. 2018. 03. 204.

[8] Fabiani A, Versari A, Parpinello GP, et al. High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate [J]. J Chromatogr Sci, 2002, 40(1): 14-18. DOI: 10. 1093/chromsci/40. 1. 14.

[9] Shao J, Wang C, Shen Y, et al. Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of tea components: A bibliometric review [J]. Front Chem, 2022, 9: 818461. DOI: 10. 3389/fchem. 2021. 818-461.

[10] Du H, Chen G, Wang J. Highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based graphene electrode for rapid detection of microplastics [J]. Sci Total Environ, 2023, 862: 160873. DOI: 10. 1016/j. scitotenv. 2022. 160873.

(收稿日期 2023-08-04)
 (本文编辑:石俊强)