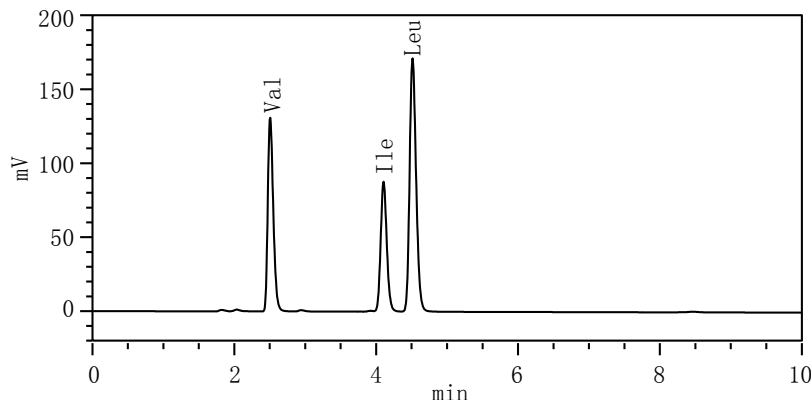


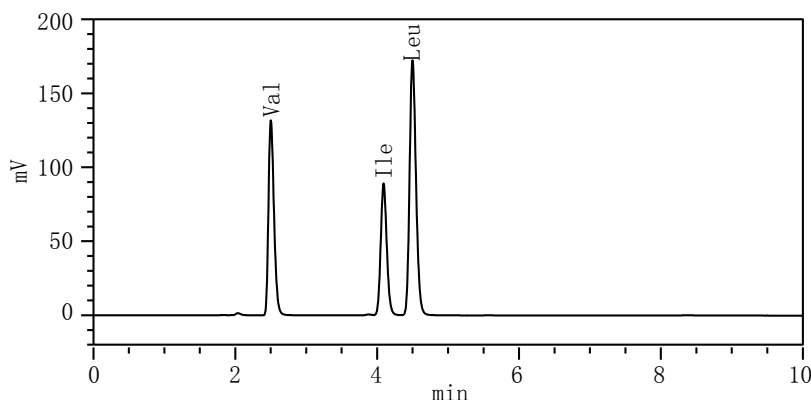
在2011年4月生效的日本药典第16版中, 针对异亮氨酸 / 亮氨酸 / 缬氨酸颗粒的鉴别试验, 规定使用常规色谱柱以HPLC进行测定。此外, 关于其含量测定, 规定使用茚三酮柱后衍生法进行测定。

在此使用日立高效液相色谱仪 Chromaster 和 L-8900全自动氨基酸分析仪, 以药典规定的测定条件实施了鉴别试验和含量测定, 并比较了系统适用性等内容的规定值和测定值。

■使用 Chromaster 进行的鉴别试验



【标准样品测定例】



【异亮氨酸 / 亮氨酸 / 缬氨酸颗粒的测定例】

<各成分的浓度>

成分名称	浓度(mg/mL)
Val : 缬氨酸	1.10
Ile: 异亮氨酸	0.92
Leu : 亮氨酸	1.84

<色谱条件>

色谱柱 : HITACHI LaChrom C18 (3 μm)
4.6 mm I.D. × 150 mm
流动相 : (A) / 乙腈 = 970 / 30 (v/v)
流速 : 0.9 mL/min
柱温 : 40 °C
检测波长 : UV 210 nm
进样量 : 20 μL

* (A) : 将 31.2 g 磷酸二氢钠二水合物溶于 1000 mL 的水中, 加磷酸调pH值至2.8。

* 调整流速, 使得缬氨酸的保留时间约为 2.5分钟。

<样品的配制方法>

称量相当于 92 mg L-异亮氨酸的样品, 以流动相溶解并定容至100 mL。使用 0.45 μm 滤膜过滤, 作为进样样品。

【鉴别试验】

鉴别试验中得到的系统适用性如下, 结果满足要求值。

此外, 鉴别试验的要求事项“峰的保留时间相等”也得到了如下确认。

<标准样品的系统适用性>

项目		系统适用性要求值	测定结果
系统性能	洗脱顺序	Val、Ile、Leu的顺序	OK
	Ile -Leu 的分离度	1.5 以上	2.55
系统的重现性	各峰保留时间的相对标准偏差 (n = 6)	1.0 % 以下	0.05 % (Val) 0.09 % (Ile) 0.09 % (Leu)

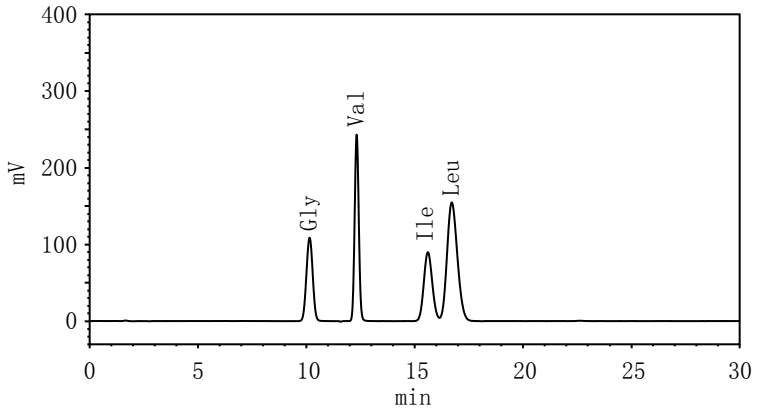
<鉴别试验结果>

成分名称	要求事项	标准样品的保留时间 (min)	样品的保留时间 (min)
Val : 缬氨酸	峰的保留时间相等	2.51	2.50
Ile : 异亮氨酸		4.11	4.09
Leu : 亮氨酸		4.51	4.50

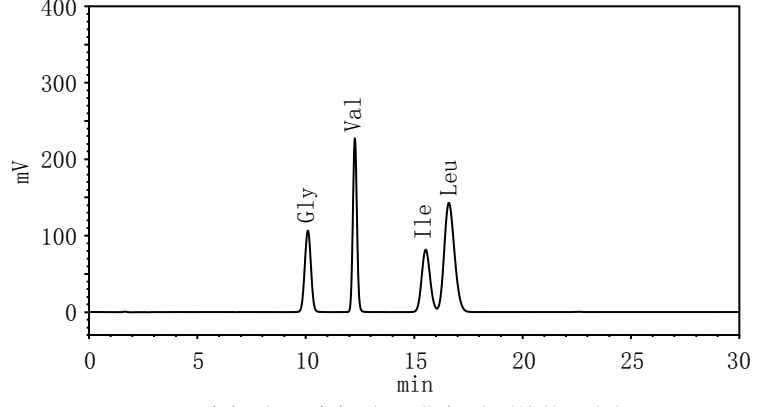
* 本分析样品由庆应义塾大学药学部 创药物理化学讲座提供。

主要仪器配置: Chromaster 5110泵、5210自动进样器、5310柱温箱、5410UV检测器

■使用 L-8900 的定量法



【标准样品测定例】



【异亮氨酸 / 亮氨酸 / 缬氨酸颗粒的测定例】

<各成分的浓度>

成分名称	进样品中的浓度 (ng/20 μL)
Gly : 甘氨酸 (内标物)	400
Val : 缬氨酸	960
Ile : 异亮氨酸	800
Leu : 亮氨酸	1600

<标准分析法色谱条件>

分析柱	: #2622PH 4.6 mm I.D. × 60 mm
脱氨柱	: #2650L 4.6 mm I.D. × 40 mm
流动相	: PH Buffer Kit
流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 57 °C
反应液	: Ninhydrin coloring solution kit for HITACHI
反应液流速	: 0.35 mL/min
反应温度	: 130 °C
检测波长	: VIS 570 nm
进样量	: 20 μL

<样品的配制方法>

称量相当于 0.95 g L-异亮氨酸的样品, 加入 10 mL 内标溶液 (甘氨酸) (*), 以 0.1 mol/L 的盐酸试液溶解并定容至 250 mL。量取该溶液 2 mL, 以 0.02 mol/L 的盐酸试液定容至 200 mL, 使用 0.2 μm 滤膜过滤后, 作为样品溶液。
 (*) 内标溶液 甘氨酸的 0.1 mol/L 盐酸试液溶液 (1 g/20 mL)

【定量法】

含量测定中得到的系统适用性如下, 结果满足要求值。此外, 将定量结果一并提供以作参考。另外, 测定条件中记载的市售试剂 (流动相、反应液) 与药典中规定的组成一致, 因此无需配制, 可直接使用。

<标准样品的系统适用性>

项目	系统适用性要求值	测定结果
系统性能	洗脱顺序	Val、Ile、Leu的顺序
	Ile -Leu 的分离度	1.2 以上
系统的重现性	内标物 (Gly) 与各峰面积比的相对标准偏差 (n = 6)	0.09 % (Val) 0.17 % (Ile) 0.09 % (Leu)

<定量结果>

成分名称	含有量 / 标示量 × 100 (%)	
	要求值	测定结果
Val : 缬氨酸	93.0 ~ 107.0	100.3
Ile : 异亮氨酸		98.4
Leu : 亮氨酸		100.4

* 本分析样品由庆应义塾大学药学部 创药物理化学讲座提供。

主要仪器配置 : L-8900全自动氨基酸分析仪

注意: 本资料所示数据仅为测定例用数据而非可保证仪器性能的数据。仪器只是研究用仪器, 而不是诊断、治疗或预防人或动物疾病的医疗仪器。