

# 氨基酸分析仪法(过甲酸氧化)测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸的含量

李煜, 金瓯, 郑国钢, 洪利娅(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

**摘要:**目的 建立测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸的含量方法。方法 采用柱前衍生-氨基酸分析仪测定。结果 胱氨酸在  $20.46\sim 184.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系( $r=0.999\ 8$ ), 平均回收率为  $100.8\%$ ,  $\text{RSD}(n=9)$  为  $0.91\%$ 。结论 本法专属性强、准确、快速、灵敏, 可用于测定复方氨基酸注射液中胱氨酸的含量。

**关键词:** 复方氨基酸注射液; 胱氨酸; 含量测定; 氨基酸分析仪

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)07-0871-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.027

## Determination of the Content of Cystine in Compound Amino Acids Injection (18AA) with Performic Acid Oxidation by Amino Acid Analyzer

LI Yu, JIN Ou, ZHENG Guogang, HONG Liya(*Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method to determine the content of cystine in Compound Amino Acids injection (18AA). **METHODS** The pre-column derivation and amino acid analyzer were adopted. **RESULTS** This method showed that the concentration-response relationship was linear over the range of  $20.46\sim 184.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $r=0.999\ 8$ ). The average recovery was  $100.8\%$  ( $\text{RSD}=0.91\%$ ,  $n=9$ ). **CONCLUSION** The method is specific, accurate, rapid, sensitive and suitable for the determination of content of cystine in Compound Amino Acids injection (18AA).

**KEY WORDS:** Compound Amino Acids injection (18AA); cystine; content determination; amino acid analyzer

复方氨基酸注射液(18AA)收载在《中华人民共和国卫生部药品标准》(二部)第六册(生化药品第一分册)中, 该标准无胱氨酸含量测定要求。胱氨酸是构成蛋白质的重要氨基酸, 在生理学上起

着十分重要的作用。胱氨酸的定量测定多采用高效液相色谱法、氮测定法、比色法、电泳试验法等<sup>[1-2]</sup>。这些方法常受到共存氨基酸的干扰, 对非单一胱氨酸体系选择性不好。同时, 由于处方中

作者简介: 李煜, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0571)86459422

E-mail: yuli113@126.com

胱氨酸的含量较低[含胱氨酸 0.01%(规格 5%)和 0.024%(规格 12%)], 几乎无紫外吸收以及复方氨基酸注射液(18AA)多重组分的复杂性和氨基酸化学结构的特殊性, 无法建立有效的胱氨酸含量测定方法。本实验报道了柱前衍生-氨基酸分析仪测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸的含量, 有较好专属性和准确度, 待测物分辨率好, 样品稳定。

## 1 仪器与试剂

L8900 型氨基酸分析仪(日本日立)。离子交换

柱(4.6 mm×60 mm, 3 μm), 树脂: 日立专用离子交换树脂; 柱温: 135 ℃; 可见光检测器波长: 570 nm; 流动相见表 1。流动相流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 分析时间: 30 min。进样量: 2 μL。

胱氨酸对照品(中国生物制品鉴定研究院, 批号: 140624-200805, 含量: 100.0%); 复方氨基酸注射液(18AA)(某企业提供, 28 批次, 规格: 5%和 12%); 水为重蒸水; 其余试剂均为分析纯。氨基酸分析仪用各种缓冲溶液(三菱化学株式会社); 茚三酮溶液(和光纯药工业株式会社)。

表 1 流动相的组成

Tab. 1 The composition of mobile phase

| t/min | B1/% | B2/% | B4/% | B6/% | 流速/mL·min <sup>-1</sup> | 温度/℃ | R1% | R2% | R3% | 流速/mL·min <sup>-1</sup> |
|-------|------|------|------|------|-------------------------|------|-----|-----|-----|-------------------------|
| 0.0   | 100  | 0    | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | 50  | 50  | 0   | 0.350                   |
| 2.7   | 100  | 0    | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 2.8   | 0    | 0    | 100  | 0    | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 3.8   | 0    | 0    | 100  | 0    | 0.4                     | 57   | 50  | 50  | 0   | 0.350                   |
| 3.9   | 0    | 0    | 0    | 100  | 0.4                     | 57   | 0   | 0   | 100 | 0.350                   |
| 15.0  | 0    | 0    | 0    | 100  | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 15.1  | 0    | 100  | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 16.0  | 0    | 100  | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 16.1  | 100  | 0    | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | —   | —   | —   | 0.350                   |
| 17.0  | —    | —    | —    | —    | 0.4                     | 57   | 0   | 0   | 100 | 0.350                   |
| 17.1  | —    | —    | —    | —    | 0.4                     | 57   | 50  | 50  | 0   | 0.350                   |
| 30.0  | 100  | 0    | 0    | 0    | 0.4                     | 57   | 50  | 50  | 0   | 0.350                   |

注: 缓冲液: B1-pH-1; B2-pH-2; B4-pH-4; B6-RH-RG; R1-茚三酮; R2-茚三酮的缓冲溶液; R3-5%乙醇

Note: the buffer solution: B1-pH-1; B2-pH-2; B4-pH-4; B6-RH-RG; R1-ninhydrin; R2-the buffer solution of ninhydrin; R3-5% ethanol

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精密量取本品为供试品溶液(临用新开)。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品, 加入少量盐酸配制成 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 浓度的溶液即为对照品溶液(临用新制)。

### 2.2 测定方法

分别取对照品溶液和供试品溶液 1.0 mL, 加入 30%过氧化氢溶液-甲酸(1:9) (临用新制)<sup>[3]</sup> 10 μL 进行氧化处理, 置冰水浴中 2 h, 真空干燥后, 加入 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 1.0 mL 溶解, 用 0.22 μm 的滤膜过滤后进入氨基酸分析仪进行分析。

### 2.3 线性关系考察

取胱氨酸对照品适量, 精密称定, 用水溶解

并定量稀释成 20, 50, 80, 100, 120, 150, 180 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 按“2.2”项下方法测定, 考察线性关系。结果表明, 对照品溶液浓度在 20.46~184.10 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性良好, 相关系数为 0.999 8。

### 2.4 重复性试验

对批号为 NTB0009EE 的样品按“2.2”项下方法进行重复性试验测定, 结果含量为 73.8%, 74.1%, 74.1%, 74.1%, 73.9%, 74.0%, 平均含量为 74.0%, RSD 为 0.17%。

### 2.5 回收率试验

取本品(批号: NTB0009EE)进行回收率实验, 分别取对照品溶液 0.3, 0.5, 0.7 mL, 分别加本品 0.5 mL, 混合后为供试品溶液, 按“2.2”项下方法测定, 结果见表 2。

表 2 回收率实验结果(n=9)

Tab. 2 Results of recovery test(n=9)

| 样品原<br>有量/ mg | 加入量/<br>mg | 测得量/<br>mg | 回收率/<br>% | 平均回<br>收率/% | RSD/% |
|---------------|------------|------------|-----------|-------------|-------|
| 0.37          | 0.030 7    | 0.068 14   | 101.5     |             |       |
| 0.37          | 0.030 7    | 0.067 88   | 100.7     |             |       |
| 0.37          | 0.030 7    | 0.068 32   | 102.1     |             |       |
| 0.37          | 0.051 1    | 0.087 73   | 99.2      |             |       |
| 0.37          | 0.051 1    | 0.089 04   | 101.8     | 100.8%      | 0.91% |
| 0.37          | 0.051 1    | 0.088 51   | 100.7     |             |       |
| 0.37          | 0.071 6    | 0.108 59   | 100.0     |             |       |
| 0.37          | 0.071 6    | 0.108 73   | 100.2     |             |       |
| 0.37          | 0.071 6    | 0.109 24   | 100.9     |             |       |

表 3 样品含量测定结果

Tab. 3 Results of sample assay determination

| 批号         | 含量/%  | 规格/% | 折算   | 批号         | 含量/% | 规格/% | 折算   |
|------------|-------|------|------|------------|------|------|------|
| 120201M6   | 61.1  | 5    | 61.1 | 120202     | 64.5 | 5    | 64.5 |
| 1204231    | 73.8  | 5    | 73.8 | 2011100602 | 94.0 | 5    | 94.0 |
| 81FB1312   | 82.7  | 5    | 82.7 | NTB0009EE  | 74.0 | 5    | 74.0 |
| 1109303    | 65.0  | 5    | 65.0 | 2A12021603 | 63.0 | 5    | 63.0 |
| 1111225108 | 83.5  | 5    | 83.5 | 11120801   | 71.3 | 5    | 71.3 |
| 110904-1   | 86.4  | 5    | 86.4 | 120306704  | 61.7 | 5    | 61.7 |
| 120101     | 69.8  | 5    | 69.8 | 11101431   | 84.3 | 5    | 84.3 |
| 20120331   | 53.1  | 5    | 53.1 | M12032708  | 69.7 | 5    | 69.7 |
| GA1105002  | 152.9 | 12   | 63.7 | 120610103  | 78.5 | 5    | 78.5 |
| 12031701   | 52.5  | 5    | 52.5 | 201203094  | 80.1 | 5    | 80.1 |
| C120426E1  | 80.0  | 5    | 80.0 | 12031511   | 48.6 | 5    | 48.6 |
| 80FB052    | 63.6  | 5    | 63.6 | 11120011   | 64.5 | 5    | 64.5 |
| 2012032162 | 75.4  | 5    | 75.4 | 12020802   | 71.0 | 5    | 71.0 |
| 1202012    | 91.4  | 5    | 91.4 | 1108126-01 | 79.1 | 5    | 79.1 |

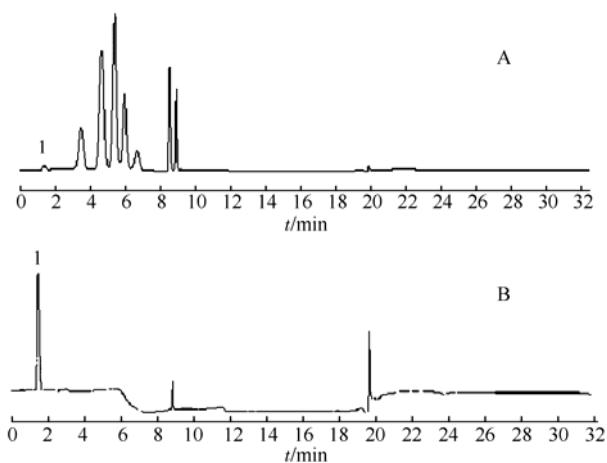


图 1 氨基酸分析仪溶液谱图

A-供试品溶液; B-对照品溶液; 1-磺基丙氨酸

Fig. 1 Amino acid analyzer chromatograms

A-standard solution; B-control solution; 1-cysteic acid

## 2.6 测定结果

对 28 个厂家的 28 批样品按“2.2”项下方法进行测定(由于保密原因, 厂家未写出, 批号及规格见表 2), 结果见表 3。供试品溶液和对照品溶液的色谱图(批号: NTB0009EE)见图 1[注: 2 种规格分别含胱氨酸 0.01%(规格: 5%)和 0.024%(规格: 12%), 0.01%(规格: 5%)的规格与对照品溶液一致, 不需要折算。而 0.024%(规格: 12%)规格的样品要除以折算系数(0.024/0.01=2.4)计算含量]。

## 3 讨论

本法是将胱氨酸衍生为磺基丙氨酸后用氨基酸分析仪来测定, 磺基丙氨酸保留时间较短, 不受其他氨基酸的干扰, 分离度较好, 样品稳定, 能够设置较短的分析时间(30 min, 包括再生时间)。笔者尝试将胱氨酸衍生为磺基丙氨酸后 HPLC 测定, 但是供试品溶液中其他氨基酸有干扰, 分离度达不到要求。不经过柱前衍生, 用氨基酸分析仪测定能够检出胱氨酸, 但是其响应较低, 且与基线分离不完全, 无法定量计算。

胱氨酸在空气中不稳定, 对照品需临用新制, 供试品溶液需临用新开。本法不能区别检查胱氨酸和半胱氨酸, 但是对本实验影响不大。本法阴性对照实验结果表明对实验无干扰。

在实验中 30%过氧化氢溶液-甲酸(1: 9)(临用

新制)的用量也进行了考察,分别考察了 10, 20, 50  $\mu\text{L}$  的用量, 10  $\mu\text{L}$  和 20  $\mu\text{L}$  的氧化产物相差不大,但是 50  $\mu\text{L}$  的氧化产物就有很多杂质出现。所以选择 10  $\mu\text{L}$  来进行氧化。另外,氨基酸分析仪的进样量不能太大,容易过载,经过实验选择 2  $\mu\text{L}$  的进样量。

胱氨酸作为处方中唯一未被控制的成分,对其进行检测对于产品的质量控制在非常有必要,根据所测定的胱氨酸含量,部分生产企业数据相差较大。

## REFERENCES

- [1] WANG W L. Determination of cystine tablets by colorimetry [J]. Chin J Biopharm(中国生物药学杂志), 2000, 21(6): 293-294.
- [2] XIA S J, SHAO H, CHEN G. Determination of cystine (cysteine) in soy sauce with pre-column derivation by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg(中国食品卫生杂志), 2008, 20(4): 304-308.
- [3] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 1133.

收稿日期: 2013-07-29