

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.019

柱前衍生高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液中 盐酸半胱氨酸含量*

陈娟, 陈志永, 孟雪, 崔小敏, 任慧, 乔园, 陈瑞明[△]

(陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 建立测定复方氨基酸注射液中盐酸半胱氨酸含量的柱前衍生高效液相色谱(HPLC)法。方法 衍生化试剂选取2,4-二硝基氟苯(DNFB),色谱柱采用Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.014 mol/L磷酸氢二钾溶液(pH=8.2, 35:65, V/V),检测波长为360 nm,流速为1.0 mL/min,柱温为30℃。结果 盐酸半胱氨酸的衍生化反应条件为衍生化试剂-盐酸半胱氨酸(80:1, V/V),60℃水浴暗处反应5 min;盐酸半胱氨酸进样量在0.132 0~0.660 0 μg($r=0.999\ 7$)范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率为98.85%,RSD为0.50%($n=6$)。结论 该方法反应温度低,反应时间短,且简便易操作,结果准确,可用于复方氨基酸注射液中盐酸半胱氨酸含量的测定。

关键词:2,4-二硝基氟苯;柱前衍生;高效液相色谱法;盐酸半胱氨酸;复方氨基酸注射液

中图分类号:R927.2;R977.4

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0074-03

Content Determination of the Cysteine Hydrochloride in Compound Amino Acid Injection by Pre-column Derivatization HPLC

CHEN Juan, CHEN Zhiyong, MENG Xue, CUI Xiaomin, REN Hui, QIAO Yuan, CHEN Ruiming

(Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710061)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method with pre-column derivation for the determination of cysteine hydrochloride in compound amino acid injection. **Methods** 2,4-Dinitrochlorobenzene was used for the pre-column derivatization agent. The analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile:0.014 mol/L dipotassium hydrogen phosphate solution(pH=8.2, 35:65, V/V) as the mobile phase. The detection wavelength was set at 360 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was kept at 30℃. **Results** The derivatization reaction conditions of cysteine hydrochloride was that the ratio between the derivatization dosage and cysteine content was 80:1, V/V, and the reaction in a dark bath at 60℃ for 5 min. Cysteine hydrochloride showed good linearity in the range of 0.1320-0.6600 μg($r=0.999\ 7$). The average recovery was 98.85% with RSD of 0.50% ($n=6$). **Conclusion** The method has low reaction temperature, short reaction time, simple operation and accurate results, which can be used for the content determination of cysteine hydrochloride in Compound Amino Acid Injection.

Key words: 2,4-dinitrochlorobenzene; pre-column derivation; high performance liquid chromatography; cysteine hydrochloride; Compound Amino Acid Injection

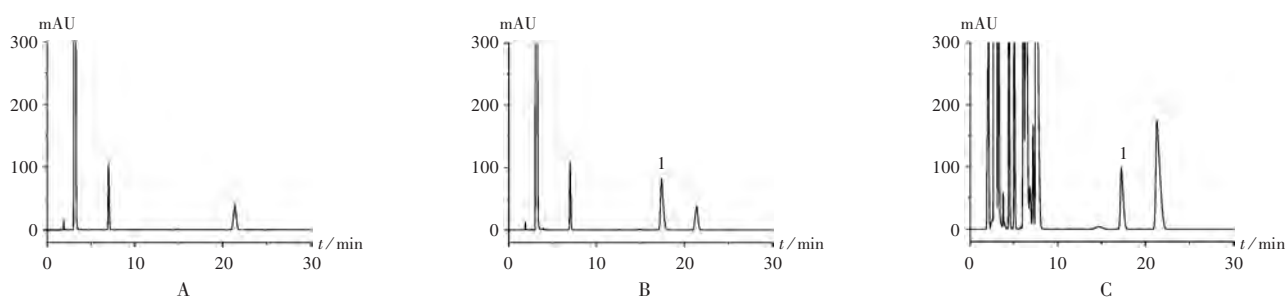
复方氨基酸注射液适用于蛋白质摄入不足、吸收障碍等氨基酸不能满足机体代谢需要的患者,临床应用广泛^[1-3]。处方中多含少量盐酸半胱氨酸,规格较小且共存氨基酸较多,常用柱前或柱后衍生氨基酸分析方法进行测定。但盐酸半胱氨酸的检测灵敏度不够强,其与共存氨基酸的分离度欠佳,无法对盐酸半胱氨酸进行准确地定量测定。现行国家药品标准规定的盐酸半胱氨酸测定方法均为用甲酸和过氧化氢氧化后,通过测定氧化产物的含量来计算含量,该方法专属性差,测定的是氧化产物磺基丙氨酸,如原料中混入胱氨酸,或盐酸半胱氨酸降解为胱氨酸,均会造成较大误差^[4-7]。张莹等^[8]采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生法测定复方氨基酸注射

液(3AA)中氨基酸含量,发现当异硫氰酸苯酯乙腈溶液的质量浓度较低时衍生物峰面积较小,质量浓度较高又会产生其他衍生物。阚微娜等^[9]用异硫氰酸苯酯与氨基酸衍生化后,测定了复方氨基酸注射液(9AA)中的盐酸半胱氨酸含量,发现盐酸半胱氨酸峰极易受到相邻其他氨基酸峰的干扰,且不易重现。涂崇范等^[10]采用氟苯柱前衍生测定半胱氨酸含量,反应时间长且反应温度高。本研究中以2,4-二硝基氟苯(DNFB)为衍生化试剂,通过对试剂用量、试验反应温度和反应时间进行考察,优化反应条件。该方法反应温度低,反应时间短,且简便易操作,结果准确,可用于复方氨基酸注射液(18AA-V)中盐酸半胱氨酸含量的测定。现报道如下。

*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2019SF-298];陕西省中医药研究院项目[2018-03]。

第一作者:陈娟,女,博士研究生,助理研究员,研究方向为药物制剂的质量标准与活性成分,(电子信箱)chenjuan_2007jie@163.com。

[△]通信作者:陈瑞明,女,大学本科,副主任药师,研究方向为中药药理学,(电子信箱)262543980@qq.com。



1. 盐酸半胱氨酸
A. 空白溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BS210S 型电子天平(精度为万分之一),BT25S 型电子天平(精度为十万分之一),均购自北京赛多利斯天平有限公司;DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

盐酸半胱氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 140699-201001);复方氨基酸注射液(18AA-V,湖北一半天制药有限公司,批号分别为 20190219,20190311,20190332);乙腈为色谱纯,水为超纯水,2,4-二硝基氟苯(DNFB)为生化试剂,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及衍生化反应条件

色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.014 mol/L 磷酸氢二钾溶液(pH=8.2,35:65, V/V);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 360 nm;柱温为 30℃;进样量为 20 μL。

衍生化反应条件:衍生化试剂-盐酸半胱氨酸(80:1, V/V);反应温度为 60℃ 水浴;反应时间为暗处反应 5 min。

2.2 溶液制备

衍生化试剂:称取 2,4-二硝基氟苯(DNFB)适量,加入乙腈使溶解,终浓度为 1%,即得。

对照品溶液:取盐酸半胱氨酸对照品适量,精密称定,加水溶解并制成质量浓度为 0.44 mg/mL 的溶液。精密量取 0.5 mL,置 10 mL 容量瓶,加入 1% DNFB 乙腈溶液 2 mL,再加入 5% 碳酸氢钠溶液 1 mL,混匀。衍生化反应在避光条件下进行,于 60℃ 水浴 5 min,取出,室温放置,用磷酸盐缓冲液(pH=7.0)稀释至刻度,摇匀,即得^[11]。

供试品溶液:精密吸取复方氨基酸注射液 0.5 mL,按对照品溶液制备方法制备供试品溶液,即得。

空白溶液:精密吸取超纯水 0.5 mL,按对照品溶液制备方法制备空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪并分析。结果空白溶液不干扰盐酸半胱氨酸的检测,且盐酸半胱氨酸峰与相邻氨基酸峰达到有效分离。详见图 1。

线性关系考察:取盐酸半胱氨酸对照品适量,精密称定,加水溶解,制成 6.6,11.0,17.6,22.0,26.4,33.0 μg/mL 系列对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标拟合标准曲线,得回归方程 $Y=68.955X+1.0856$, $r=0.9997$ ($n=6$)。结果表明,盐酸半胱氨酸进样量在 0.1320~0.6600 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限(LOD)和定量限(LOQ)考察:取对照品溶液并逐步稀释,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱峰响应值。以 LOD($S/N \geq 3$)和 LOQ($S/N \geq 10$)为考察指标,计算得盐酸半胱氨酸的 LOD 为 0.1014 ng,LOQ 为 0.2838 ng。

重复性试验:取样品(批号为 20190219),依法平行制备供试品溶液 6 份,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸半胱氨酸含量的 RSD 为 0.57% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一衍生化供试品溶液,室温条件下分别于 0,2,4,6,8 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸半胱氨酸峰面积的 RSD 为 0.32% ($n=5$),表明供试品溶液在室温条件下 8 h 内稳定。

加样回收试验:取盐酸半胱氨酸对照品 44 mg,精密称定,共 6 份,分别置 100 mL 容量瓶,加入样品稀释液至刻度,溶解,摇匀。取 0.5 mL 置 20 mL 容量瓶,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备衍生化供试品溶液。按拟订

表1 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
40.08	44.12	83.46	98.32	98.85	0.50
40.08	44.51	84.10	98.90		
40.08	44.78	84.40	98.97		
40.08	44.28	84.24	99.73		
40.08	44.24	83.70	98.60		
40.08	44.66	84.10	98.57		

色谱条件进样测定,记录峰面积。结果3批样品(批号分别为20190219,20190311,20190332)的含量分别为91.10%,91.52%,90.68%。

3 讨论

3.1 测定波长选择

盐酸半胱氨酸对照品溶液经衍生化后,在220~500 nm波长范围内进行紫外扫描,结果显示,在360 nm波长处有最大吸收,故选择360 nm作为检测波长。

3.2 流动相选择及优化

曾考察甲醇和乙腈,发现选用乙腈时峰形较好;同时,考察了醋酸钠溶液、磷酸氢二钠溶液和磷酸氢二钾溶液,发现选用磷酸氢二钾溶液时峰形较好。通过调整乙腈和磷酸氢二钾溶液比例,最终确定体积比为35:65,盐酸半胱氨酸出峰时间约为17 min,与其他干扰峰达到良好分离。

3.3 衍生化反应条件选择

衍生试剂加入量考察:精密吸取2.2项下对照品溶液6份,以加入不同量(8,16,40,80,160,320倍)的衍生化试剂考察,并进行液相分析,进样量为20 μ L。结果表明,当衍生化试剂与盐酸半胱氨酸体积比大于40:1时,样品中衍生化产物的峰面积无变化,故本试验中选择体积比为80:1。

衍生化反应时间考察:精密吸取2.2项下对照品溶液5份,以不同反应时间(5,10,15,20,30 min)进行考察,制备样品进行液相分析,进样量为20 μ L。结果表明,衍生化反应时间超过5 min,衍生化产物的峰面积无明显变化。故本试验中优选的反应时间为5 min。

衍生化反应温度考察:精密吸取2.2项下对照品溶液5份,以不同反应温度(室温,40,60,80 $^{\circ}$ C)进行考察,并进行液相分析,进样量为20 μ L。结果表明,当反应温度高于60 $^{\circ}$ C时,样品衍生化产物的峰面积无变化,故优选的反应温度为60 $^{\circ}$ C。

氨基酸含量的测定通常选用柱前衍生法。本试验中分别从衍生化试剂的加入量、试验的反应温度及反应时间进行考察,得到优选条件:衍生化试剂-盐酸半胱氨酸(80:1, V/V),反应温度为60 $^{\circ}$ C水浴,于暗处反应5 min。徐崇范等^[10]选用80 $^{\circ}$ C水浴中加热30 min测定依达拉奉注射液中盐酸半胱氨酸含量;徐伟娜等^[11]选用60 $^{\circ}$ C水浴暗处反应20 min进行乙酰氨基酚注射液中盐酸半胱氨酸的测定。本研究中的衍生化反应条件与其相比,反应温度低,且反应时间短,节约了检测时间。

3.4 方法评价

本研究建立的测定复方氨基酸注射液中盐酸半胱氨酸含量的方法操作简便,准确稳定,重复性好,可用于复方氨基酸注射液的质量控制。

参考文献:

- [1] 李莉,崔红艳,钟家琪,等. HPLC法同时直接测定复方氨基酸注射液(18AA)中的蛋氨酸亚砷和蛋氨酸砷[J]. 分析试验室, 2018,37(11):1309-1314.
- [2] UNGER N, HOLZGRABE U. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018,147:125-139.
- [3] 李莉,周颖,崔红艳,等. 复方氨基酸注射液(18AA)中焦谷氨酸的限量检查方法研究[J]. 云南化工, 2018,45(6):124-127.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:815-816.
- [5] 郭志洲,朱恒怡,赵欣庆,等. 小儿复方氨基酸注射液中盐酸半胱氨酸的含量测定[J]. 广东药科大学学报, 2018,34(6):700-703.
- [6] 倪美萍,卞玮,陈英,等. 依达拉奉注射液中L-半胱氨酸盐酸盐的柱前衍生-HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016,47(6):780-782.
- [7] 方方,纪宇. 过甲酸氧化柱前衍生HPLC法测定复方氨基酸注射液(18AA-V)中盐酸半胱氨酸含量[J]. 海峡药学, 2016,28(12):43-45.
- [8] 张莹,黄哲魁. 异硫氰酸苯酯柱前衍生法测定复方氨基酸注射液(3AA)中氨基酸含量[J]. 天津药学, 2013,25(4):17-20.
- [9] 阙微娜,王沪凯. 高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液(9AA)中抗氧化剂的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2012,33(6):833-836.
- [10] 徐崇范,高磊,赵春香. RP-HPLC测定依达拉奉注射液中L-半胱氨酸盐酸盐含量[J]. 中国药学杂志, 2010,45(18):1420-1422.
- [11] 徐伟娜,刘林,李永贵,等. 两种方法测定对乙酰氨基酚注射液中盐酸半胱氨酸含量的比较研究[J]. 食品与药品, 2017,19(5):330-333.

(收稿日期:2019-11-27;修回日期:2020-01-11)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办