HPLC 法测定复方氨基酸注射液（18AA）中胱氨酸与半胱氨酸的含量及其在药品质量评价中的应用

邵天舒，郭　雷，李　潇，周长明*

（北京市药品检验研究院，国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，
中药成分分析与生物评价北京市重点实验室，北京 102206）

摘要：建立了 HPLC 法测定复方氨基酸注射液（18AA）中胱氨酸（**1**）与半胱氨酸（**2**）的含量。色谱柱采用 Waters SunFire C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm），流动相 A 为硫酸铵缓冲液∶乙腈（97 ∶ 3），B 为乙腈，梯度洗脱。检测波长为 205 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 25 μl。结果显示，**1** 和 **2** 分别在 0.002 ～ 0.040 mg/ml 和 0.001 ～ 0.027 mg/ml 内线性关系良好，检测限分别为 0.99、0.67 μg/ml，平均回收率（n=9）分别为 102.3%和 100.5%，RSD 分别为 1.6%和 1.5%。处方模拟试验结果显示，样品中 **1** 含量低于标示量可能与抗氧剂亚硫酸氢钠的添加有关。建立的方法简便、快速、准确，可为复方氨基酸注射液中 **1** 和 **2** 的测定提供参考。

关键词：高效液相色谱；复方氨基酸注射液；胱氨酸；半胱氨酸

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)10-1494-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.016

Determination of Cystine and Cysteine in Compound Amino Acid Injection (18AA) by HPLC and Its Application in Drug Quality Evaluation

SHAO Tianshu, GUO Lei, LI Xiao, ZHOU Changming*

(*Beijing Key Lab. of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, NMPA Key Lab. for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206*)

ABSTRACT: An HPLC method was established to determine the content of cystine (**1**) and cysteine (**2**) in compound amino acid injection (18AA). The Waters SunFire C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode, with ammonium sulfate buffer∶acetonitrile (97∶3) as mobile phase A, acetonitrile as mobile phase B. The detection wavelength was 205 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 25 μl. The results showed that it was linear for **1** and **2** in the 0.002 − 0.040 mg/ml and 0.001 − 0.027 mg/ml, respectively. The detection limits were 0.99 and 0.67 μg/ml, respectively. The mean recoveries (n=9) of **1** and **2** were 102.3% and 100.5%, with the RSDs of 1.6% and 1.5%. The results of the simulation test on the formulation showed that the content of **1** in the sample was lower than the labeled amount, which might be related to the addition of the antioxidant sodium bisulfite. The established method is simple, rapid and accurate, which can provide a reference for the determination of **1** and **2** in compound amino acid injection.

Key Words: HPLC; compound amino acid injection; cystine; cysteine

复方氨基酸注射液（18AA）是由 18 种氨基酸以及辅料亚硫酸氢钠和山梨醇按一定比例配制而成的一类平衡型氨基酸补充剂，临床上主要用于不能口服或经肠道补给营养，以及营养不能满足需要的患者，通过静脉输注本品以满足机体获取氨基酸合成蛋白质的需要[1−2]。复方氨基酸注射液主要为 5%

收稿日期：2021-03-05

基金项目：国家药典委员会药品标准制修订研究课题—复方氨基酸注射液处方中含胱氨酸的品种含量测定方法优化(2020H01)

作者简介：邵天舒(1983—)，男，副主任药师，从事生化药物及生物制品质量控制研究。

通信作者：周长明(1965—)，男，主任药师，从事生化药物及生物制品质量控制研究。

E-mail：zcm.602@163.com

和 12% 2 种总氨基酸浓度规格。根据《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）二部收载的质量标准，胱氨酸（cystine，**1**）是 18 种氨基酸处方中唯一未控制含量限度的氨基酸。作为人体必需氨基酸中的一种，**1** 具有促进细胞氧化还原功能以及中和毒素、促进白细胞增生等重要的生理活性[3]，因此其含量是否符合处方规定对产品的有效性具有重要影响，有必要对其含量进行控制。

复方氨基酸注射液中可能存在 **1** 的降解产物半胱氨酸（cysteine，**2**），李煜等建立了先用过甲酸将 **1** 氧化为磺基丙氨酸（cysteic acid，**3**），再用氨基酸分析仪测定其含量的方法[4]，但此方法存在一定的不足之处，即复方氨基酸注射液中可能存在的 **1** 降解产物 **2** 还可以与辅料亚硫酸氢钠继续发生反应产生 **3**，导致无法区分 2 种来源的 **3**，即无法准确计算样品中所含 **1** 的含量。

本研究建立了 HPLC 法同时测定复方氨基酸注射液（18AA）中的 **1** 和 **2**，无需柱前或柱后衍生反应，方法简便、快速、准确，以期为该产品的质量标准提升以及同类别的其他产品中 **1** 和 **2** 的测定提供参考。

1 仪器与试药

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪，配备紫外检测器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

复方氨基酸注射液（18AA）[共 18 批，分别由国内 6 家企业生产，其中批号 21904262、21906241、21910093（规格 5 %）和批号 21904282、21907143、22003241（规格 12 %）为 D 公司生产；批号 1120030601、1118060302、1118060301（规格 5 %）和批号 1120020904（规格 12 %）为 L 公司生产；批号 80PA093、80PA094、80PA095（规格 5%）为 H 公司生产；批号 20191102（规格 5%）为 Y 公司生产；批号 1A18102904（规格 5%）为 Q 公司生产；批号 2003132141、2003132142、2003132145（规格 5%）为 C 公司生产]；**1** 对照品（含量 99.8%，批号 140624-201506）和 **2** 盐酸盐对照品（含量 89.5%，批号 140699-201803）（中国食品药品检定研究院）；**3** 对照品（日本 TCI 公司，含量 98.0%，批号 XBLMM-QA）；乙腈、盐酸、庚烷磺酸钠和硫酸铵均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Waters SunFire C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为硫酸铵缓冲液（取硫酸铵 5 g，庚烷磺酸钠 5.25 g，加水 900 ml 溶解，用盐酸调至 pH 1.5，加水至 1 000 ml）∶乙腈（97 ∶ 3），B 为乙腈，梯度洗脱（0—18 min，A 100%；18—27 min，A 100%—A 55%；27—32 min，A 55%—100%；32—55 min，A 100%）；流速 1.0 ml/min；检测波长 205 nm；柱温 40 ℃；进样量 25 μl。

2.2 溶液配制

供试品溶液：精密量取复方氨基酸注射液（18AA）2 ml，置 20 ml 量瓶（12%规格样品）或 10 ml 量瓶（5%规格样品）中，加水定容，作为供试品溶液。

混合对照品溶液：取 **1** 和 **2** 盐酸盐对照品各适量，加入少量 2 mol/L 盐酸溶解后，加水稀释至每 1 ml 含 **1** 和 **2**（此处为 **2** 的浓度，已折算）各约 0.2 mg 的溶液，作为混合对照品贮备液；精密量取上述混合对照品贮备液 2 ml，置 20 ml 量瓶中，加水定容，作为混合对照品溶液。

本底溶液：按 12%规格处方（不加 **1**）浓度配制 17 种氨基酸及辅料溶液，量取该溶液 2 ml，置 20 ml 量瓶，加水定容，作为本底溶液。

分离度验证溶液：按 12%规格处方（不加 **1**）浓度配制 17 种氨基酸及辅料溶液，精密量取该溶液及混合对照品贮备液各 2 ml，置同一 20 ml 量瓶中，加水定容，作为分离度验证溶液。

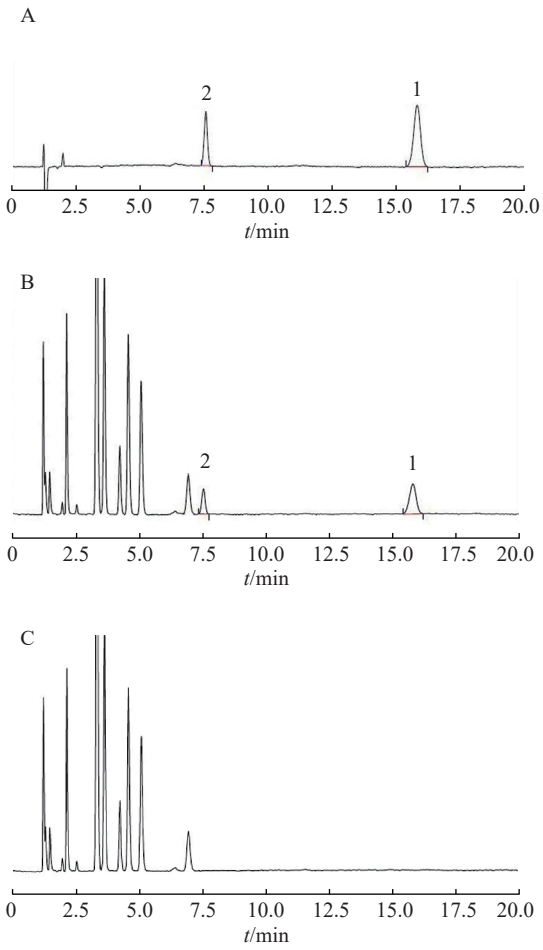
2.3 方法学验证

2.3.1 系统适用性试验

分别取“**2.2**”项下混合对照品溶液、分离度验证溶液和本底溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图。结果见图 1，**2** 与其前方杂质峰的分离度为 2.53，与 **1** 峰的分离度为 22.74，本底溶液中各组分对 **1**、**2** 出峰均无干扰。

2.3.2 线性试验

精密称取 **1** 对照品约 50 mg，置 50 ml 量瓶中，加入少量 2 mol/L 盐酸溶解并加水定容，摇匀，作



A：混合对照品溶液，B：分离度验证溶液，C：本底溶液。1—**1**；2—**2**。

图 1　典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms

为 **1** 对照品贮备液（**1** 质量浓度约为 1 mg/ml）；精密称取 **2** 盐酸盐对照品约 100 mg，置 100 ml 量瓶中，加水溶解并定容，摇匀，作为 **2** 对照品贮备液（**2** 质量浓度约为 0.686 mg/ml）。分别精密量取上述 2 种对照品贮备液各 0.1、0.25、0.5、1、2 ml，置 50 ml 量瓶中，加水定容，配制系列线性试验用溶液。以质量浓度 *c* 为横坐标，峰面积 *A* 为纵坐标，绘制标准曲线，得 **1** 和 **2** 的线性方程，分别为 *A*=36.848*c* – 0.005 9 和 *A*=59.329*c* – 0.032 3，*r* 均为 0.999 9，说明 **1** 和 **2** 分别在 0.002 ～ 0.040 mg/ml 和 0.001 4 ～ 0.027 mg/ml 内线性关系良好。

2.3.3　回收率试验

除 **1** 和亚硫酸氢钠以外（因亚硫酸氢钠有促使 **1** 转化为其他产物的作用，为避免对结果的准确性产生影响，故回收率验证时不添加亚硫酸氢钠，详见本研究讨论“**3.2**”项下），按 12%规格处方浓度配制 17 种氨基酸及辅料溶液，作为收率试验贮备液，精密量取该溶液 2 ml，置 20 ml 量瓶中，加水定容，作为回收率试验本底溶液。分别量取上述回收率试验贮备液 5 ml，各置 50 ml 量瓶中，分别精密加入“**2.3.2**”项下的 **1** 对照品贮备液和 **2** 对照品贮备液各 0.8、1.0、1.2 ml（每个浓度水平 3 份，每个品种共 9 份），加水定容，摇匀，分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，按外标法分别计算回收率。结果显示，**1** 和 **2** 的平均回收率（*n*=9）分别为 102.3%和 100.5%，RSD 分别为 1.6%和 1.5%。

2.3.4　重复性试验

按“**2.3.3**”项下回收率试验溶液配制方法制备 6 份回收率试验溶液（**1** 加标量为 0.020 21 mg/ml，**2** 加标量为 0.013 72 mg/ml），作为重复性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，**1** 和 **2** 的平均含量（*n*=6）分别为 0.020 42、0.013 55 mg/ml，RSD 分别为 0.8%和 1.6%，说明重复性良好。

2.3.5　定量限（LOQ）与检测限（LOD）

分别取“**2.3.2**”项下 **1** 对照品贮备液、**2** 对照品贮备液，逐级稀释后，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）为 10 ∶ 1 时的浓度为定量限，*S*/*N* 为 3 ∶ 1 的浓度为检测限。结果显示，**1** 和 **2** 的定量限分别为 1.97、1.34 μg/ml，检测限分别为 0.99、0.67 μg/ml。

2.4　样品测定

取 18 批复方氨基酸注射液（18AA），以外标法按峰面积计算样品中的 **1** 和 **2** 的含量。结果显示，12%规格样品中 **1** 含量均低于或接近定量限；5%规格样品中 **1** 含量均低于或接近检测限，具体结果见表 1。

3　讨论

3.1　流动相 pH 的选择

本试验中，**2** 与其前面的其他氨基酸峰能否有效分离是 **2** 准确定量的重要前提。而流动相 pH 对此有较为关键的作用，pH 越低则该分离度越好，但 pH 过低、酸度过大则又会对色谱柱造成较大的

损害。因此，保持流动相其他条件不变，分别考察流动相 pH 调节为 1.40、1.77 及 1.98 时分离度的变化，并与拟定方法（pH 1.5，本次试验调至 pH 1.54）进行比较。发现当流动相 pH 从 1.40 升至 1.54 时，分离度变化不大，均大于 2.5；而 pH 升至 1.77 时，分离度有所降低，但仍大于 1.5；pH 升至 1.98 时则无法分离。因此，综合考虑有效分离与保护色谱柱的需要，将流动相 pH 定为 1.5。

3.2 样品测定结果的分析

ChP 2020 规定 5%、12%浓度的产品处方中 **1** 含量分别为 0.10、0.24 mg/ml。通过测定 6 个厂家生产的 18 批复方氨基酸注射液（18AA），发现全部供试品溶液中的 **1** 含量均远低于标准规定。其中，5%产品的供试品溶液中 **1** 基本为未检出；而 12%产品供试品溶液中 **1** 虽有检出，但也均未达到定量限，折算稀释倍数（10 倍）后可知结果不足标示量的 8.2%。同时各批样品中还均检出处方中未包含的 **2**。通过测定各生产企业提供的 **1** 原料药，其含量均在 99.2%～100.8%，且均未检出 **2**，因此推测制剂中 **1** 含量偏低以及 **2** 的产生均非原料药造成，而是在制剂的生产或贮存过程中，**1** 发生了还原反应，二硫键断开，生成 **2**。通过对处方中的组分进行分析发现，作为抗氧剂添加的辅料亚硫酸氢钠是一种具有较强还原性的物质，有促使 **1** 向 **2** 发生转化的可能。为此，笔者设计了处方模拟试验用以验证上述判断：即除不添加亚硫酸氢钠外，按照药典处方组成配制 18 种氨基酸及其他辅料溶液，并将其均分成 2 份，其中 1 份作为对照溶液，向另 1 份加入终质量浓度为 0.5 mg/ml 的亚硫酸氢钠，并在加入后 1、2、3、4、5 h 测定其中的 **1** 和 **2** 含量。结果显示，当加入亚硫酸氢钠后，溶液中 **1** 含量迅速下降，并在 2 h 内几乎降至检测限之下，同时 **2** 含量上升；而对照溶液的 **1** 含量在 5 h 内基本不变，且 **2** 基本未检出。

此外，笔者还通过氨基酸分析仪测定法在各批次样品中检出了 **3** 和极少量的牛磺酸（taurine，**4**），具体结果见表 1，这 2 种成分在未添加亚硫酸氢钠的模拟试验溶液中均未检出。通过氨基酸分析仪对全部 18 批次样品的 **3**、**4** 含量进行测定，并将 **2**、**3**、**4** 的含量分别按照各自相对分子质量及其与 **1** 的物质的量比（2 ∶ 1）进行折算，汇总见表 1。

上述结果可以初步证明，抗氧剂亚硫酸氢钠的

表 1 样品中 1、2、3 和 4 含量的测定结果

Tab.1 Determination Results of **1**, **2**, **3** and **4** in Samples

厂家	规格	批号	含量/mg·ml^{-1}					折算后 **1** 含量总和相当于 **1** 的标示量 /%
			1	**2**	**3**	**4**	折算后 **1** 含量总和 [1)]	
D	5%	21904262	<LOD	0.033	0.057	0.003	0.076	76.1
		21906241	<LOD	0.035	0.057	0.003	0.078	78.1
		21910093	<LOD	0.034	0.056	0.003	0.076	76.4
	12%	21904282	<LOQ	0.084	0.132	0.006	0.194	80.8
		21907143	<LOQ	0.079	0.119	0.006	0.177	73.6
		22003241	<LOQ	0.085	0.120	0.006	0.182	76.0
L	5%	1120030601	<LOD	0.036	0.052	0.002	0.075	74.6
		1118060302	<LOD	0.036	0.059	0.002	0.080	79.5
		1118060301	<LOD	0.038	0.059	0.002	0.082	81.5
	12%	1120020904	<LOQ	0.068	0.135	0.012	0.184	76.6
H	5%	80PA094	<LOD	0.040	0.054	0.003	0.081	80.9
		80PA093	<LOD	0.038	0.055	0.003	0.080	79.6
		80PA095	<LOD	0.039	0.055	0.003	0.081	80.6
Y	5%	20191102	<LOD	0.028	0.058	0.004	0.073	72.8
Q	5%	1A18102904	<LOD	0.027	0.057	0.004	0.071	71.1
C	5%	2003132141	<LOD	0.030	0.054	0.005	0.073	72.9
		2003132142	<LOD	0.030	0.056	0.004	0.073	73.4
		2003132145	<LOD	0.030	0.055	0.004	0.073	72.7

[1)] 为 **2**、**3**、**4** 含量按照反应物质的量比及相对分子质量关系折算回 **1** 的含量后，与溶液中剩余的 **1** 含量之和。

存在与本品中 **1** 含量远低于标示量的现象存在一定关联，亚硫酸氢钠能够促使 **1** 发生还原生成 **2**，而生成的 **2** 进一步发生氧化反应生成 **3** 和 **4**。这也是本方法建立时，回收率试验本底溶液配制时不添加亚硫酸氢钠的原因。各生产企业在反馈的资料中均表示，**1** 均是按处方量 100%投料，但 18 批样品的实际测定结果相当于 **1** 标示量在 71.1%～81.5%，与 100%处方量有一定的差异，表明在复方氨基酸注射液类产品中，除 **2**、**3**、**4** 外，**1** 还有其他转化产物未被发现，其转化过程既有还原反应，也有氧化反应，反应发生的确切条件及详细机制尚待深入研究。但鉴于 **1** 对人体的重要生理功能，建议在今后的质量标准提升过程中，重新考量抗氧剂的添加量，在生产厂家进一步优化充氮工艺、并对不同类型包材对产品残氧量的影响进行深入研究的基础上，尽量减少抗氧剂的添加，以减少 **1** 的转化，并把 **1** 的含量列为必检项，以保障产品质量。

参考文献：

[1] 连　莹, 杜明牵, 乔　冲, 等. 复方氨基酸注射液营养学评价[J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(5): 584-588.

[2] NINA U, ULRIKE H. Stability and assessment of amino acids in parenteral nutrition solutions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, **147**: 125-139.

[3] 焦　红, 胡烨敏, 曾燕媚, 等. 食品中L-胱氨酸的检测方法: 中国, 106770779A[P]. 2017-05-31.

[4] 李　煜, 金　瓯, 郑国钢, 等. 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[J]. 中国现代应用药学, 2014, **31**(7): 871-874.