氨基酸分析仪测定胱氨酸片中胱氨酸的含量

李名路,庞小莲*,陈凤

(广西壮族自治区玉林食品药品检验所,玉林 537000)

摘要 **目的:**《中华人民共和国药典》(以下简称中国药典)2015年版采用滴定法测定胱氨酸片中胱氨酸的含量,操作烦琐,所以建立简便、快速的氨基酸分析仪测定胱氨酸片中胱氨酸含量的方法。**方法:**采用直接超声溶解法上机测定,Sykam Cation Separation Coiumn(LCA KO6/Na 4.6 mm×150 mm,7 μm)分离柱,梯度洗脱,分光光度检测器,柱温为57~74 ℃梯度控温,反应器温度为130 ℃,检测波长570 nm。**结果:**胱氨酸在5.01~100.18 μg·mL^{-1}之间呈良好的线性关系(r=0.999 9,n=6),平均加样回收率为100.0%(n=9),检出限为0.26 μg·mL^{-1},含量测定结果与滴定法相比较,无显著性差异。**结论:**与中国药典的滴定法比较,该法准确、简易、稳定,适合胱氨酸片中胱氨酸的含量测定。

关键词:氨基酸分析仪;胱氨酸片;胱氨酸;含量测定;方法比较

中图分类号:R 917 **文献标识码:**A **文章编号:**0254-1793(2018)05-0889-05

doi:10.16155/j.0254-1793.2018.05.22

Determination of cystine in cystine tablets by amino acid analyzer

LI Ming-lu, PANG Xiao-lian*, CHEN Feng

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Yulin Institute for Food and Drug Control, Yulin 537000, China)

Abstract **Objective:** The titration method used to measure the content of cystine in cystine tablets, which is applied in Chinese Pharmacopeia 2015, is tedious. In this paper, we meant to establish a simple and rapid amino acid analyzer for the determination of cystine in cystine tablets. **Methods:** The direct ultrasonic dissolving method was adopted for the determination. Sykam Cation Separation Coiumn (LCA KO6/Na 4.6×150 mm) was used with gradient elution, followed by a spectrophotometric detector. Column temperature between 57-74 ℃. Thereactor temperature was 130 ℃. The detection wavelength was 570 nm. **Results:** Good linearity (r=0.999 9, n=6) can be obtained with the concentration of cystine among 5.01-100.18 μg·mL^{-1}. The average sample recovery rate was 100.0% (n=9) and the detection limit was 0.26 μg·mL^{-1}. Compared with the titration method, there was no significant difference in the detection results. **Conclusion:** Compared with the titration method in Chinese Pharmacopeia, this method is accurate, simple and stable, which is suitable for the content determination of cystine.

Keywords: amino acid analyzer; cystine tablets; cystine; content determination; comparison of methods

* 通信作者 Tel:13977538373;E-mail:41875235@qq.com

第一作者 Tel:18269308699;E-mail:286018229@qq.com

胱氨酸片为氨基酸类药,其有效成分胱氨酸作为人体所必需的重要氨基酸之一,在生理学上起着十分重要的作用,主要用于病后和产后继发性脱发症、慢性肝炎的辅助治疗,临床上常用胱氨酸片配伍其他药物治疗斑秃[1-3]。胱氨酸片的含量测定,中国药典2015年版二部采用滴定法[4],虽然可以满足胱氨酸的测定要求,但也存在不足,如滴定靠肉眼识别判断终点,存在个人偏差,而且其终点的颜色易受滴定温度、光照等环境因素影响,同时测定所需的2种滴定液配制标定复杂,滴定液浓度易变化,不稳定,不适合大批量检测样品。目前报道的胱氨酸片定量测定方法除药典经典方法外,主要还有比色法[5]、单扫描极谱法[6-7]、二次微分简易示波伏安法[8]和分光光度法[9-10]等,氨基酸分析仪法[11-12]、紫外光谱法[13]、荧光探针法[14]、离子色谱安培法[15]、高效液相色谱法及结合其他设备法[16-19]等新型检测技术也逐步被运用于测定不同基质中的胱氨酸含量。应用氨基酸分析仪来测定胱氨酸片的含量,成本相对较低,专属性强,结果稳定性高,不易受其他因素的干扰。因此,本实验利用氨基酸分析仪,建立一种直接、快速测定胱氨酸片中胱氨酸含量的方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

S433-D氨基酸分析仪(德国赛卡姆(北京)科学仪器有限公司),XS-205DU电子天平,梅特勒-托利多中国METTLER TOLEDO公司生产;SYNERGY-UV纯水机,法国Millipore公司生产;Ameritech AVP-7160隔膜真空泵,美瑞泰克(天津)科技有限公司生产;S470-B多参数测试仪,梅特勒-托利多中国METTLER TOLEDO公司生产;KQ-250DB型数控超声波清洗器(舒美牌台式),昆山市超声仪器有限公司生产。

1.2 试药

胱氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140624-201506,供鉴别和含量测定用,含量为99.8%);胱氨酸片(山西云鹏制药有限公司/山西汾河制药有限公司,规格每片50 mg,批号A160102、A160401、150201、160201);甲醇为色谱纯;乙二胺四乙酸、柠檬酸钠、氢氧化钠、苯酚、硼酸均为优级纯,购于天津市科密欧化学试剂有限公司;三水醋酸钠、醋酸、盐酸、醋酸钾均为优级纯,购于国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇为分析纯,购于广东光华科技股份有限公司;柠檬酸为优级纯,购于天津市光复科技有限公司;水合茚三酮为优级纯,购于上海三爱思;实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 样品稀释液的制备

取柠檬酸钠19.60 g于1 L的烧杯中,分别加无水乙醇20 mL,硼酸1.20 g,盐酸17.3 mL,水约800 mL,搅拌溶解,转移溶液至1 000 mL量瓶中,最后用水定容至刻度,摇匀,制得样品稀释液,待用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称量胱氨酸对照品50.19 mg于100 mL量瓶中,加入稀盐酸溶液2 mL摇匀,再加样品稀释液适量,超声(250 W,100 kHz)5 min,放冷至室温后,用样品稀释液定容至刻度,摇匀,制得浓度为0.50 mg·mL^{-1}的对照品溶液,待用。

2.3 样品溶液的制备

取本品20片,精密称定,研匀,精密称量胱氨酸粉末约10 mg,置100 mL量瓶中,加入适量的样品稀释液,超声(250 W,100 kHz)15 min,放冷至室温后,再用样品稀释液定容至刻度,摇匀,过0.45 μm滤膜,即得。

2.4 色谱条件

采用Sykam Cation Separation Coiumn(LCA KO6/Na 4.6 mm×150 mm)分离柱,LCA KO4/Na(4.6 mm×100 mm)预柱,以洗脱泵0.45 mL·min^{-1}+衍生泵0.25 mL·min^{-1}为流速,分光光度检测器,进行梯度洗脱,柱温为57~74 ℃梯度控温,反应器温度为130 ℃,检测波长570 nm,进样量20 μL。流动相组成详见表1,柱温程序详见表2。

2.5 专属性考察

取“2.2”项下对照品溶液、“2.3”项下样品溶液,精密吸取20 μL,按上述色谱条件上机进行测定。结果见图1,图上无明显杂质峰,表明其专属性强。

2.6 线性关系考察

取“2.2”项下对照品溶液0.10、0.20、0.50、1.00、1.50、2.00 mL,分别置10 mL量瓶中,然后用上述样品稀释液定容至刻度,配制成质量浓度为5.01、10.02、25.04、50.09、75.14、100.18 μg·mL^{-1}的溶液,精密吸取20 μL,在“2.4”项色谱条件下测定。以胱氨酸对照品峰面积的积分值为纵坐标,浓度为横坐标,作线性回归分析,得回归方程:

Y=141.45X-95.179 r=0.999 9

表 1 流动相组成

Tab. 1 Composition of mobile phase

时间 (time)/min	缓冲液 A (buffer A)/%	缓冲液 B (buffer B)/%	再生液 D (regeneration fluid D)/%	洗脱泵流速 (elution pump velocity)/(mL·min^{-1})	衍生泵流速 (derived pump velocity)/(mL·min^{-1})
初始(the initial)	100.00	0.00	0.00	0.45	0.25
2.50	100.00	0.00	0.00	0.45	0.25
11.00	85.00	15.00	0.00	0.45	0.25
17.00	80.00	20.00	0.00	0.45	0.25
23.00	67.00	33.00	0.00	0.45	0.25
27.00	20.00	80.00	0.00	0.45	0.25
29.00	20.00	80.00	0.00	0.45	0.25
30.00	0.00	100.00	0.00	0.45	0.25
31.00	0.00	0.00	100.00	0.45	0
35.00	100.00	0.00	0.00	0.45	0

表 2 柱温程序

Tab. 2 Column temperature program

时间 (time)/min	温度 (temperature)/℃
初始的(the initial)	57
22.00	57
27.00	74
35.00	57

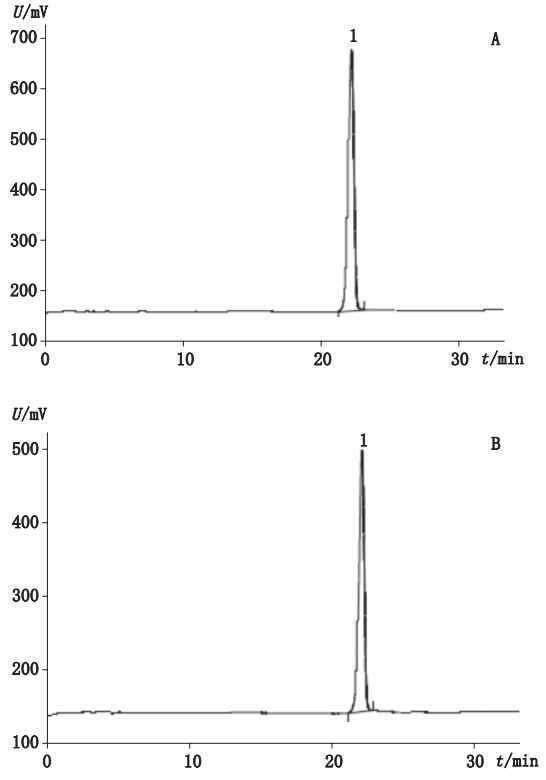

图 1 胱氨酸对照品(A)、胱氨酸片样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of cystine standard(A)and cystine tablets sample(B)

胱氨酸的线性范围在 5.01~100.18 μg·mL^{-1} 之间。表明该方法有良好的线性关系。

2.7 精密度试验

取“2.6”项下质量浓度为 75.14 μg·mL^{-1} 的对照品溶液,连续进样 6 次,按上述“2.4”项下的色谱条件进行精密度测定。结果胱氨酸峰面积的 RSD 为 0.10%(n=6),表明该方法的仪器精密度令人满意。

2.8 重复性试验

取胱氨酸片(批号:A160102)供试品 6 份,按“2.3”项下方法制备胱氨酸供试品溶液,然后在“2.4”项色谱条件下测定。测得胱氨酸平均含量(标示量%)为 97.38%,RSD 为 0.22 %(n=6),表明该方法的重现性良好。

2.9 稳定性试验

取同一份供试品(批号:A160102),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 20 μL,在“2.4”项下色谱条件测定。测得胱氨酸峰面积的 RSD 为 0.19%(n=6),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 回收率试验和检测下限

精密称取已知含量供试品片粉 9 份(批号 A160102),每 3 份一组,置于 100 mL 量瓶中,分别加入“2.2”项下对照品溶液 3、4.5、6 mL,再加样品稀释液适量,超声(250 W,100 kHz)15 min,放冷至室温后,用样品稀释液定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 的微孔滤膜,即得低、中、高 3 种不同浓度的回收溶液。在“2.4”项色谱条件下测定,由回归方程算出该方法的回收率。结果胱氨酸 3 个加入量所对应的平均回收率分别为 99.4%、100.1%、100.6%,RSD 分 别 为 1.0%、0.68%、

0.69%，总平均回收率为100.0%（n=9）。以对照品溶液3.15的信噪比计算该方法的检出下限，结果为0.26 μg·mL^{-1}。

2.11 样品测定

2.11.1 滴定法 取胱氨酸片4批（批号A160102、A160401、150201、160201），每批取供试品10份，按中国药典2015年版方法测定胱氨酸的含量（标示量%），结果均符合中国药典规定且RSD均小于0.50%，见表3。

表3 样品测定结果和两法比较结果

Tab. 3 Results of sample determination with two methods

批号（lot No.）	滴定法（titration）		本文方法（this method）		t
	平均含量（average content）/%	RSD/%	平均含量（average content）/%	RSD/%	
A160102	97.20	0.47	97.33	0.30	0.77
A160401	98.04	0.40	98.22	0.25	1.20
150201	97.39	0.37	97.51	0.35	0.77
160201	96.36	0.24	96.51	0.22	1.41

2.11.2 本文方法 取胱氨酸片4批（批号A160102、A160401、150201、160201），每批取供试品10份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件测定含量，通过回归方程计算胱氨酸的含量（标示量%），结果均符合中国药典规定且RSD均小于0.50%，结果见表3。

2.12 两法的测定结果比较

用SPSS统计软件对2种方法的测定结果进行统计分析，发现其t值均小于查表的$t_{0.05/2,\ 18}$=2.101，故P>0.05，差异无统计学意义。结果表明：同一批号的胱氨酸片采用不同方法测定胱氨酸的含量，2种测定结果无显著性差异。

3 讨论

3.1 样品处理方法

本法采用直接超声溶解法处理样品后，上机测定胱氨酸片中胱氨酸的含量，发现其峰形和重复性良好，精密度高，专属性强，且操作简便，引入误差机会少，干扰少，适合大批量检测样品。实验发现，中国药典采用滴定法对胱氨酸片中胱氨酸进行含量测定时，样品前处理步骤烦琐，耗时较长，检验效率偏低，易受其他因素干扰，容易造成误差，不适合大批量检测样品。

3.2 样品稀释液

胱氨酸不仅具有比较活泼的还原性质，而且也属于人体氨基酸中含硫的氨基酸，因此容易被氧化。本法使用柠檬酸三钠－盐酸－无水乙醇－苯酚作为样品稀释液，发现胱氨酸片在其中易溶，峰形较良好，无分差，无干扰，且稳定性好；添加适量的苯酚可以使其稳定保存，故选用此样品稀释液进行含量测定。但采用上述样品稀释液直接溶解其高浓度的对照品胱氨酸时，发现需要超声很久才能使其完全溶解。通过实验，发现胱氨酸易溶于稀酸，且加入稀酸后上机测定，发现其峰形和峰面积未受到影响，故在处理对照品胱氨酸时，先加入2 mL的稀盐酸溶液。

3.3 色谱条件

胱氨酸具有含硫基团，在空气中不稳定，对照品和供试品溶液需临用新制。采用本法处理后的对照品或供试品溶液均稳定，且可以使用氨基酸分析仪装机推荐的方法，无需修改色谱条件，便可进行测定，且胱氨酸的峰形良好，无拖尾峰，其余氨基酸对于胱氨酸出峰时间和位置无干扰，而且没有其他明显的干扰峰等。本实验不需要考察新的色谱条件，就可以直接上机测定，大大地提高了检验效率。梯度洗脱和梯度控温也可根据实际需要和具体样品进行调整，以缩短出峰时间，提高检验效率。

3.4 本法与滴定法比较

比较本法与中国药典滴定法[4]的含量测定结果，本法结果稍偏高，可能是由于滴定法在硫代硫酸钠滴定过程中因溴的挥发，使得滴定结果偏低所致。但同一批号的胱氨酸片采用2种不同的方法来测定其胱氨酸的含量，结果无显著性差异。滴定法易受其他因素影响，如操作过程烦琐，需要肉眼判断滴定终点，容易出现操作误差，滴定终点的判断受温度、光照等环境影响；同时，采用对照品溶液来滴定，滴定液配制复杂，浓度易变化，不稳定，且易过期，不适合大批量检测样品。本法采用样品稀释液直接超声溶解样品，前处理简单，外界环境干扰少，溶液稳定；使用氨基酸分析仪可以准确、快速地测出胱氨酸片中胱氨酸的含量，并且该仪器的专属性强，灵敏度高，适用于大批量胱氨酸片中胱氨酸的含量测定。

4 结论

本实验使用氨基酸分析仪，建立一种测定胱氨酸片含量的方法，与中国药典的滴定法比较，分析速度、操作方法等方面有了大幅度提升，可以进行大批量样品检测，为使用氨基酸分析仪进行胱氨酸片的含量测定提供一种更快速、简便的新方法。

参考文献

[1] 路永红,周谦. 斑秃丸联合胱氨酸治疗斑秃31例疗效分析[J]. 中国皮肤性病学杂志,2007,21(6):382
LU YH, ZHOU Q. Clinical analysis of the treatment of 31 cases of alopecia areata combined with cystine[J]. Chin J Dermatovenereol, 2007, 21(6): 382

[2] 魏建华,叶超然. 复方甘草酸苷片联合胱氨酸片治疗斑秃的临床效果观察[J]. 西南军医,2014,16(6):641.
WEI JH, YE CR. The clinical effect of compound glycyrrhizin tablets combined with cysteine tablets in the treatment of alopecia areata[J]. Southwest Mil Med, 2014, 16(6): 641

[3] 王永胜,党耀平. 滋补生发片联合胱氨酸治疗斑秃31例疗效观察[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2011,27(7):515
WANG YS, DANG YP. Effect observation on the treatment of 31 cases of alopecia in the treatment of erythrocystine[J]. Chin J Lepr Dermatol, 2011, 27(7): 515

[4] 中华人民共和国药典2015年版. 二部[S]. 2015:1175
ChP 2015. Vol Ⅱ[S]. 2015: 1175

[5] 王万岭. 比色法测定胱胺酸片的含量[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(6):293
WANG WL. Colorimetric determination of cystamine tablets[J]. Chin J Biochem Med, 2000, 21(6): 293

[6] 马红霞,刘桂艳,李耀仓. 单扫描极谱法快速测定胱氨酸[J]. 武汉生物工程学院学报,2007,3(2):79
MA HX, LIU GY, LI YC. Rapid determination of cystine by single scanning polarography[J]. J Wuhan Inst Bioeng, 2007, 3(2): 79

[7] 李耀仓,罗登柏. 胱氨酸在硼酸盐溶液中的极谱吸附波及其应用[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2004,23(3):9
LI YC, LUO DB. The polarographic adsorption of cystine in the borate solution is affected by its application[J]. J Cent South Nation Univ(Nat Sci Ed), 2004, 23(3): 9

[8] 陶福芳,郑建斌. 胱氨酸的二次微分简易示波伏安法测定[J]. 电化学,2003,9(4):471
TAO FF, ZHENG JB. Determination of the secondary differential of cysteine by simple oscillovoltammetry[J]. Electrochemistry, 2003, 9(4): 471

[9] 杨春梅,李省云. 胱氨酸与7,7,8,8-四氰基对苯醌二甲叉的荷移反应研究[J]. 分析科学学报,2014,30(2):207
YANG CM, LI XY. Study on the charge transfer reaction of cystine with 7,7,8,8-4 cyanocyanyl on benzoquinone[J]. J Anal Sci, 2014, 30(2): 207

[10] 郝晋青. 胱氨酸的光学性质及其应用研究[J]. 光谱实验室,2007,24(2):191
HAO JQ. The optical properties and application of cystine[J]. Spectrosc Lab, 2007, 24(2): 191

[11] 叶少文. 氨基酸自动分析仪测定游离*L*-半胱氨酸[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(8):3129
YW SW. Amino acid automatic analyzer for determination of free *L*-cysteine[J]. J Food Saf Qual Inspect, 2015, 6(8): 3129

[12] 李煜,金砚,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
LI Y, JIN O, ZHENG GG, *et al*. Amino acid analyzer(performic acid)was used to determine the content of cystine in compound amino acid injection(18AA)[J]. Chin Mod Appl Pharm, 2014, 31(7): 871

[13] 路敏,马玲. 紫外光谱法测定半胱氨酸的含量研究[J]. 晋中学院学报,2017,34(3):41
LU M, MA L. Determination of cysteine content by ultraviolet spectrometry[J]. J Jinzhong Univ, 2017, 34(3): 41

[14] 陆金鑫,马会民. 利用BODIPY类荧光探针测定血清中游离的半胱氨酸[C]// 中国化学会第十六届有机分析与生物分析学术研讨会论文集. 20111:72
LU JQ, MA HM. Determination of Non-protein Cysteine in Human Serum by a Designed BODIPY-based Fluorescent Probe[C]// Proceedings of the 16th Symposium on Organic Analysis and Biological Analysis of the Chinese Chemical Society. 20111: 172

[15] 石磊,钟春明,林青峰,等. 离子色谱安培法测定尿液中的胱氨酸[J]. 化学分析计量,2017,26(3):72
SHI L, ZHONG CM, LIN QF, *et al*. Determination of cystine in urine by ion chromatography[J]. Chem Anal Meter, 2017, 26(3): 72

[16] 周长美,朱航桦,刘华良,等. 尿中*N*-乙酰基-*S*-(正丙基)-*L*-半胱氨酸测定的高效液相色谱—质谱法[J]. 中国劳动卫生职业病杂质,2015,33(5):394
ZHOU CM, ZHU HJ, LIU HL, *et al*. A high performance liquid chromatographic method for determination of *N*-acetyl-*S*-(*n*-propyl)-*L*-cysteine in urine[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2015, 33(5): 394

[17] 吴诗华,郭嘉明,陈纠,等. 尿中*N*-乙酰-*S*-(2-氨基甲酰乙基)-半胱氨酸测定的高效液相色谱法[J]. 中国劳动卫生职业病杂质,2015,33(12):936
WU SH, GUO JM, CHEN J, *et al*. HPLC method for determination of *N*-acetyl-*S*-(2-carbamyl ethyl)-cysteine in urine[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2015, 33(12): 936

[18] 池小彬,陈素华,王露,等. 基于过甲酸氧化法HPLC-PITC柱前衍生对胱氨酸、蛋氨酸的测定[J]. 南昌航空大学学报(自然科学版),2017,31(2):84
CHI XB, CHEN SH, WANG L, *et al*. The determination of cysteine and methionine by HPLC-PITC column[J]. J Nanchang Hangkong Univ(Nat Sci), 2017, 31(2): 84

[19] 潘峰,张青,孙玮,等. HPLC-库仑阵列电化学法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. 西北大学学报(自然科学版),2010,40(1):57
PAN F, ZHANG Q, SUN W, *et al*. HPLC- coulomb array electrochemical method for determination of homocysteine in plasma[J]. J Northwestern Univ(Nat Sci Ed), 2010, 40(1): 57

(本文2017年6月1日收到)