

柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸

陈萍红, 王书芳*, 龚行楚

浙江大学 药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 采用 RP-HPLC 法同时测定阿胶中 13 种氨基酸的量。方法 阿胶以 6 mol/L 盐酸于 120 °C 水解 3 h, 以异硫氰酸苯酯柱前衍生, 用反相高效液相色谱法测定氨基酸的量。采用 Agilent Eclipse AAA 色谱柱 (75 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 以乙腈-110 mmol/L 醋酸铵溶液 (1:99) 为流动相 A、醋酸-乙腈-水 (0.05:80:20) 为流动相 B 进行梯度洗脱, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 42 °C, 检测波长为 254 nm。结果 在 36 min 内可完成对阿胶中 13 种氨基酸的分离测定, 各氨基酸的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r>0.9977$), 加样回收率为 95.2%~104.4%, RSD<5.0%。结论 方法简便、准确, 重复性好, 可用于阿胶的质量控制, 亦可为其他药物中氨基酸的分析提供参考。

关键词: 阿胶; 衍生化; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯; 高效液相色谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1995-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.024

Determination of 13 amino acids in *Asini Corii Colla* by RP-HPLC with precolumn derivatization

CHEN Ping-hong, WANG Shu-fang, GONG Xing-chu

Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for the simultaneous determination of 13 amino acids in *Asini Corii Colla*.

Methods *Asini Corii Colla* was hydrolyzed for 3 h at 120 °C using 6 mol/L hydrochloric acid, and the amino acids were determined by RP-HPLC after being derived with phenyl isothiocyanate. HPLC was performed on an Eclipse AAA column (75 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) with acetonitrile-110 mmol/L ammonium acetate solution (1:99) as mobile phase A and acetic acid-acetonitrile-water (0.05:80:20) as mobile phase B in the gradient mode at a flow rate of 0.6 mL/min. The column temperature was 42 °C, and the detection wavelength was set at 254 nm. **Results** The 13 amino acids were separated within 36 min with a good linearity ($r > 0.9977$) in the range of the test concentration. The average recoveries ($n = 3$) were 95.2%—104.4% and the RSD values were less than 5.0%.

Conclusion The method is simple, accurate, and repeatable, which could be available for the quality control of *Asini Corii Colla*. It may also serve as a good reference for the determination of amino acids in other pharmaceuticals.

Key words: *Asini Corii Colla*; derivatization; amino acids; phenyl isothiocyanate; HPLC

阿胶 *Asini Corii Colla* 又名驴皮胶、付致胶, 为马科动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶^[1]。性甘、平, 功效滋阴润燥、补血止血^[2], 始载于《神农本草经》, 列为上品。阿胶的化学成分主要为驴皮所含原胶原的降解物, 包括明胶、蛋白质及多种氨基酸。其中氨基酸作为蛋白质的基本结构单位, 也是生物代谢过程中的重要物质。《中国药典》2010 年版^[1]收录的阿胶测定项下对羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸有要求。但阿胶作为名贵中药, 具有复杂的成分, 徐康森等^[3]

对纯驴、猪、牛皮胶进行真伪鉴别和内在质量研究发现, 精氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、甘氨酸的量在不同胶类中有显著差异, 可作为纯驴皮胶区别其他两种胶的内在质量指标。因此, 为有效地对阿胶进行质量控制, 除了测定药典中规定的 4 种氨基酸, 有必要对阿胶中其他氨基酸进行检测。经典的氨基酸分析方法有柱前衍生化和柱后衍生化, 柱后衍生需要专门的柱后衍生器, 分析时间也较长。柱前衍生常用的衍生化试剂有邻苯二醛 (OPA)、2, 4-二硝基氟苯 (DNFB)、6-氨基喹啉-*N*-羟基琥珀

收稿日期: 2013-02-13

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09201-201-10)

作者简介: 陈萍红 (1989—), 女, 在读硕士, 从事药物分析研究。E-mail: chenph1989@163.com

*通信作者 王书芳 Tel: (0571)88208426 E-mail: wangsf@zju.edu.cn

珀酰亚胺基甲酸酯 (AQC)、异硫氰酸苯酯 (PITC) 等^[4], 其中 PITC 与一级氨基酸、二级氨基酸均能反应, 不生成对氨基酸测定有干扰的副产物, 且所得产物苯基硫酸盐-氨基酸 (PTC-AA) 稳定性好。程显隆等^[5]建立了阿胶中对羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸 4 种氨基酸的测定方法, 样品以 6 mol/L 盐酸于 150 °C 水解 1 h, 以 PITC 为衍生化试剂衍生后进行 HPLC 分析, 该方法准确、可靠, 具有良好的重复性和稳定性, 但只测定了阿胶中 4 种质量分数较大的氨基酸。鄢丹等^[6]采用 HPLC-ELSD 法同时测定阿胶中 17 种未衍生氨基酸的量, 在 25 min 内即可完成对 17 种氨基酸的分离测定, 但该方法的检测限为 18.2~54.6 mg/L, 对阿胶中某些质量分数较低的氨基酸 (如组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等) 的检测不够灵敏。考虑到柱前衍生 RP-HPLC 具有灵敏度高、线性范围宽等优点, 本实验建立了阿胶中多种氨基酸的柱前衍生化-HPLC 分析方法, 并对阿胶的水解条件和色谱分析条件进行了系统优化, 将该方法用于 6 个批次阿胶中 13 种氨基酸的测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (德国 Agilent 公司), 配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、ChemStation 工作站; 高压灭菌锅 (HVE—50, Hirayama Manufacturing Corporation); 电热恒温水浴锅 (DK—S24, 上海精宏实验设备有限公司); 超声波清洗器 (KQ—250E, 昆山市超声仪器有限公司); 25 mL 蓝盖试剂瓶 (德国 SCHOTT DURAN 公司)。

氨基酸对照品: 甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、赖氨酸 (上海康达氨基酸厂), 脯氨酸、亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、精氨酸 (上海康捷生物科技发展有限公司), 缬氨酸、羟脯氨酸 (BBI)、谷氨酸 (阿拉丁公司), 质量分数均大于 98%; 异硫氰酸苯酯 (PITC) 为优级纯 (阿拉丁公司), 三乙胺 (阿拉丁公司)、正己烷 (CNW Technologies GmbH 公司)、醋酸胺 (阿拉丁公司)、乙腈 (德国默克公司)、冰醋酸 (美国 TEDIA 公司) 皆为色谱纯, 浓盐酸 (国药集团化学试剂有限公司) 为分析纯, 水为 Milli-Q 水。6 批阿胶 (批号 120432、120452、120454、120455、120460、120463) 由山东东阿阿胶股份有限公司提供。

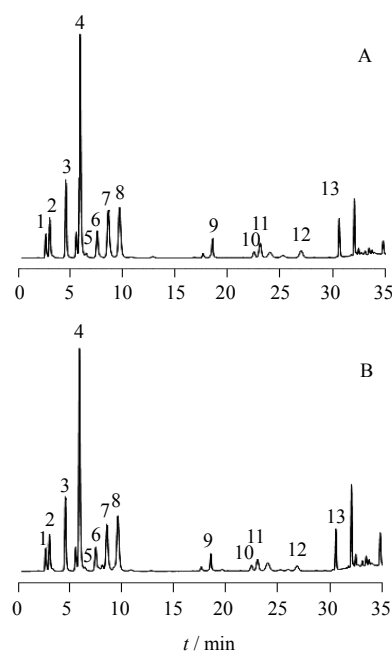
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse AAA 色谱柱 (75 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 以乙腈-110 mmol/L 醋酸胺溶液 (1:99) 为流动相 A (称取 8.394 0±0.000 5 g 醋酸胺, 加适量水溶解后继续加水至 990 mL, 然后加乙腈 10 mL, 摇匀, 即得), 以醋酸-乙腈-水 (0.05:80:20) 为流动相 B, 进行梯度洗脱, 0 min, 4% B; 2~4 min, 9% B; 9 min, 10% B; 12 min, 12% B; 15 min, 22% B; 24 min, 23% B; 27 min, 29% B; 31~36 min, 100% B; 紫外检测器, 检测波长为 254 nm; 体积流量为 0.6 mL/min; 柱温为 42 °C, 进样量为 3 μL。在上述色谱条件下, 各组分分离度良好, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

分别取天冬氨酸、谷氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸对照品适量, 精密称定, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液制成每毫升分别含



1-天冬氨酸 2-谷氨酸 3-羟脯氨酸 4-甘氨酸 5-组氨酸 6-精氨酸 7-丙氨酸 8-脯氨酸 9-缬氨酸 10-异亮氨酸 11-亮氨酸 12-苯丙氨酸 13-赖氨酸
1-aspartic acid 2-glutamic acid 3-hydroxyproline 4-glycine 5-histidine 6-arginine 7-alanine 8-proline 9-valine 10-isoleucine 11-leucine 12-phenylalanine 13-lysine

图 1 对照品 (A) 及样品 (B) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

天冬氨酸 0.25 mg、谷氨酸 0.43 mg、羟脯氨酸 0.47 mg、甘氨酸 0.92 mg、组氨酸 44 μg、精氨酸 0.44 mg、丙氨酸 0.38 mg、脯氨酸 0.50 mg、缬氨酸 97 μg、异亮氨酸 60 μg、亮氨酸 0.17 mg、苯丙氨酸 0.14 mg 和赖氨酸 0.22 mg 的混合对照品储备液。取上述溶液 0.2 mL, 置 1.5 mL 离心管中, 加入 0.1 mol/L PITC 乙腈溶液 (取 PITC 120 μL, 加乙腈定容至 10 mL, 混匀, 即得) 0.1 mL, 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液 (取三乙胺 1.39 mL, 加乙腈定容至 10 mL, 混匀, 即得) 0.1 mL, 混匀, 室温放置 1 h 后, 加入正己烷 0.4 mL, 涡旋 30 s 后静置 10 min, 取下层溶液再次加正己烷 0.4 mL 萃取, 静置 10 min 后取下层溶液 200 μL, 加 10 μL 醋酸混匀, 1×10^4 r/min 离心 10 min, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取阿胶粗粉约 20 mg, 精密称定, 置 25 mL SCOTT 蓝盖瓶中, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 mL,

超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 10 min, 并加等体积的盐酸, 于 120 °C 水解 3 h, 移入蒸发皿中, 用 10 mL 水多次洗涤, 洗液并入蒸发皿中, 蒸干, 残渣加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 定容。 1×10^4 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.2 mL, 按“2.2”项下方法自“置 1.5 mL 离心管中”起操作, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下对照品储备液 7.5、5.0、2.5、1.0、0.5、0.1 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容, 配制系列混合对照品溶液, 按“2.2”项下方法自“置 1.5 mL 离心管中”起操作即得系列浓度溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积。分别以氨基酸对照品峰面积值 (Y) 为纵坐标, 13 种氨基酸对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 绘制工作曲线, 计算回归方程, 见表 1。

表 1 13 种氨基酸的线性关系
Table 1 Linearity relationship of 13 amino acids

成分	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
天冬氨酸	$Y=11.41 X-4.227$	0.999 9	2.470~123.500
谷氨酸	$Y=11.02 X-23.85$	0.999 9	4.297~214.800
羟脯氨酸	$Y=16.09 X+14.74$	0.999 8	4.691~469.100
甘氨酸	$Y=25.69 X+143.6$	0.999 3	9.247~924.700
组氨酸	$Y=16.47 X+1.846$	0.998 8	0.436~ 43.600
精氨酸	$Y=8.224 X-0.485 3$	0.999 1	4.443~444.300
丙氨酸	$Y=21.14 X+22.56$	0.998 8	3.830~383.000
脯氨酸	$Y=17.67 X-4.120$	0.999 8	5.016~501.600
缬氨酸	$Y=20.10 X+16.21$	0.997 7	0.966~ 96.640
异亮氨酸	$Y=17.04 X-4.666$	0.999 8	0.600~ 60.040
亮氨酸	$Y=16.65 X-11.40$	0.999 7	1.667~166.700
苯丙氨酸	$Y=12.93 X-10.02$	0.999 8	1.401~140.100
赖氨酸	$Y=15.43 X-57.13$	0.999 6	2.217~221.700

2.5 稳定性试验

取同一批号 (批号 120432) 阿胶样品水解溶液, 分别于 1、2、3、4、5、7 d 进行衍生化, 每天平行制备 2 份, 测定各氨基酸的质量分数, 其质量分数的 RSD 均小于 3.9%, 表明阿胶样品水解溶液在 7 d 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批号 (批号 120432) 阿胶, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算各氨基酸平均质量分数, 所有氨基

酸质量分数的 RSD 均小于 4.9%。

2.7 精密度试验

取同一批号 (批号 120432) 阿胶, 在 6 d 内, 按“2.3”项下方法, 每天平行制备 3 份供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 计算各氨基酸平均质量分数, 所有氨基酸质量分数的 RSD 均小于 4.6%。

2.8 加样回收率试验

称取同一批号 (批号 120432) 已测定的阿胶粗粉 9 份, 每份约 10 mg, 按其中各成分质量分数的高 (125%)、中 (100%)、低 (75%) 浓度水平分别

加入 13 种对照品储备液, 按“2.3”项下方法制备每一质量浓度的溶液各 3 份, 按上述色谱条件进样测定, 计算高、中、低 3 个浓度的加样回收率。结果表明, 13 种氨基酸的平均回收率为 95.2%~104.4%, RSD<5.0% ($n=3$)。

2.9 定量测定

取 6 批东阿阿胶, 按“2.3”项制备供试品溶液, 测定, 以外标法计算, 结果见表 2, 阿胶中 13 种氨基酸平均质量分数的 RSD 在 2.1%~8.2%, 说明其质量分数相对稳定。

表 2 6 批东阿阿胶中 13 种氨基酸的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Contents of 13 amino acids in six batches of *Asini Corii Colla* ($n=3$)

批号	质量分数 / %												
	天冬氨酸	谷氨酸	羟脯氨酸	甘氨酸	组氨酸	精氨酸	丙氨酸	脯氨酸	缬氨酸	异亮氨酸	亮氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸
120432	5.67	9.83	11.01	22.04	0.89	10.16	8.67	15.00	2.10	1.35	3.14	2.41	5.05
120452	5.22	9.02	10.13	20.42	0.76	8.95	8.07	13.49	2.06	1.23	2.93	2.08	4.72
120454	5.46	8.48	10.32	20.79	0.81	9.59	8.31	12.88	2.00	1.25	2.92	2.11	4.96
120455	5.37	8.60	9.69	19.87	0.72	8.85	8.05	11.85	2.01	1.23	2.88	2.24	4.93
120460	6.02	9.74	10.89	21.89	0.82	10.14	8.76	14.10	2.10	1.32	3.13	2.22	5.21
120463	5.11	8.75	10.38	20.90	0.78	9.08	8.13	12.91	2.08	1.22	2.90	2.11	4.82

3 讨论

3.1 供试品制备方法的建立

3.1.1 水解条件考察 酸水解是蛋白质水解的常用方法, 经典的水解条件为 6 mol/L 盐酸于 110 °C 水解 24 h^[7], 耗时较长。本实验考察了 120 °C 高温下用 6 mol/L 盐酸、浓盐酸分别水解 4、8、12 h 后各氨基酸量的区别, 结果表明以上各条件的水解效率无明显差异; 将酸浓度确定为 6 mol/L 盐酸后, 考虑进一步缩短酸水解时间, 分别考察水解 1、2、3、4 h 后的氨基酸量, 结果表明水解 3 h 的效率最高, 可能是由于水解时间过短时水解未完全, 而水解时间过长破坏了氨基酸结构; 此外, 还对酸水解所需的溶剂量进行考察, 发现该因素对水解效率影响不大。

3.1.2 供试品溶液 pH 考察 衍生化反应需在碱性条件下进行, 而流动相偏酸性, 对酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)的分离度及峰形影响较大, 且色谱柱的 pH 耐受范围是 2~9, 因此, 分别考察了在衍生化后的供试液中加入 10%、5%、1% 醋酸和不加酸的情况, 发现加入 5% 醋酸时对分离度和峰形有明显改善。

3.1.3 除去衍生化试剂的步骤 由于衍生化过程的 PITC 大大过剩, 而 PITC 对色谱柱的硅胶键有一定损害, 会造成填料老化^[8], 实验中加入等体积的正己烷将其萃取出来, 比对空白样品的色谱图发现系统峰出现在 31 min 后, 据此我们考察萃取次数与 PITC 残留量的关系, 每次萃取均用相同体积的正己

烷, 发现萃取 1 次系统峰的响应值仍较高, 萃取 2 次和 3 次系统峰的响应值相差不大且较萃取 1 次明显减小, 所以后续实验均萃取 2 次。

3.2 色谱条件优化

3.2.1 色谱柱的选择 尝试采用常见的 Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 通过调整流动相组成及洗脱梯度很难达到理想的分离效果, 而 Agilent Eclipse AAA 色谱柱分离效果良好, 方法耐用性好, 故选择该色谱柱。

3.2.2 流动相组成的选择 分别对流动相 A 的盐浓度及 A、B 两相的酸量进行优化, 发现盐浓度对丙氨酸与邻近小峰的分离度有影响, 浓度为 110 mmol/L 时分离效果最佳; 当 A 相加酸时, 氨基酸出峰时间推迟且精氨酸与邻近小峰的分离度变差, 故 A 相不加酸; 当 B 相酸浓度低于 0.05% 时, 缬氨酸的色谱峰分叉成两个小峰, 高于 0.05% 时则峰形较佳, 考虑到色谱柱耐受 pH 范围, 选择 B 相酸为 0.05%。

3.2.3 体积流量的选择 分别考察了不同体积流量对各氨基酸分离情况的影响, 发现体积流量为 0.4 mL/min 时系统峰对所需定量的色谱峰产生较大干扰, 13 个组分不能达到完全分离; 体积流量为 0.8 mL/min 时亮氨酸色谱峰的峰宽变大且拖尾, 体积流量为 1.0 mL/min 时异亮氨酸与亮氨酸的分离度变差, 故将体积流量确定为 0.6 mL/min。

3.2.4 柱温的选择 分别考察柱温为 34、36、38、40、42 °C 时各氨基酸的分离情况, 结果表明柱温对亮氨酸、异亮氨酸的峰形及分离度有显著影响, 42

℃时最佳。

酸水解过程中色氨酸被彻底破坏,带硫氨基酸(半胱氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸)被氧化,酪氨酸发生卤化作用(回收率仅为 60%~80%),且长时间的水解会破坏部分带羟基的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸),天冬酰胺、谷氨酰胺水解出酰胺基,以上氨基酸或检测不到或回收率低,无法定量,其余氨基酸均能得到较准确的定量。

本实验对阿胶中氨基酸的组成及其量进行了分析,同时测定了 13 种氨基酸,该方法操作简便、结果准确,分析时间短、重复性好、可用于阿胶的质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 雷载权. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 徐康森, 张林可. 阿胶的真伪鉴别和内在质量研究 I:

纯驴、猪、黄牛和水牛皮胶的氨基酸成分的对比研究 [J]. 药物分析杂志, 1989, 9(3): 152-155.

- [4] Checa-Moreno R, Manzano E, Mirón G, *et al.* Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(22): 3817-3828.
- [5] 程显隆, 肖新月, 邹秦文, 等. 柱前衍生化 HPLC 法同时测定阿胶中 4 种主要氨基酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 1997-2000.
- [6] 鄢丹, 张毅, 韩玉梅, 等. HPLC-ELSD 法测定疏通注射液 17 种未衍生氨基酸含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 558-560.
- [7] Fountoulakis M, Lahm H W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 826(2): 109-134.
- [8] 张慧, 杨化新, 梁成罡, 等. 高效液相色谱法分析卡贝缩宫素及其有关杂质 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(10): 1553-1555.