

PITC 柱前衍生 HPLC 测定复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸的含量^{*}

汪 媛¹, 王海龙², 金高娃³, 章飞芳^{1**}, 杨丙成¹, 梁鑫淼^{1,3}

(1. 华东理工大学药学院 上海 200237; 2. 吕梁学院 吕梁 033000;

3. 中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要 :目的 :建立柱前衍生高效液相色谱法同时测定复方氨基酸注射液(18AA)中 18 种氨基酸含量的方法。方法 :样品采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生,以 Unitary-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm 5 μm)为色谱柱,检测波长为 254 nm,醋酸钠缓冲盐及乙腈、甲醇和水的混合体系为流动相,梯度洗脱。结果 :优化了衍生试剂用量、衍生时间、缓冲盐浓度以及 pH 值和柱温等影响因素,最终在 40 min 内实现了 18 种氨基酸的分离,在 9~1 021 μg·mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好,且相关系数大于 0.997 7,平均回收率为 92.6%~110.7%,相对标准偏差(RSD)为 0.01%~5.68%。其定量限(LOQ, S/N=10)为 0.02~13.41 μg·mL⁻¹。结论 :该方法操作简便、灵敏度高、准确度和精密度好,可用于复方氨基酸注射液中氨基酸的含量测定。

关键词 :柱前衍生 异硫氰酸苯酯 高效液相色谱法 复方氨基酸注射液

doi: 10.11842/wst.2014.06.025 中图分类号 :R284.1 文献标识码 :A

氨基酸可进入组织细胞,参与蛋白质的合成代谢,获得正氮平衡,并生成酶类、激素、抗体、结构蛋白,促进组织愈合,恢复正常生理功能^[1]。复方氨基酸注射液(18AA)是一类含有较高浓度的氨基酸类药物,其种类很多,其中包含人类所需的各种氨基酸^[2],因此对其氨基酸含量的控制非常重要。

目前多种氨基酸同时检测方法有很多,由于大多数氨基酸没有芳香环等生色团无法直接采用紫外或荧光检测器检测,因此其检测方法可分为直接分析法^[3]和间接分析法^[4]。直接分析法通常采用高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法,此法可同时对一级和二级氨基酸进行检测,无需柱前或柱后衍生,直接进样,分离效果好、灵敏度高、操作简单。但此类氨基酸分析仪专属性强,价格昂贵,大大限

制其推广应用。间接分析法则需要将其衍生成具有紫外响应^[5]或荧光吸收^[6]的衍生物。其中柱后衍生法是利用氨基酸在酸性条件下形成阳离子而在阳离子交换柱中分离,再对分离后的氨基酸进行衍生检测。但由于衍生反应需在特定反应器中,常造成色谱峰展宽,使分离度降低^[7]。而柱前衍生高效液相色谱法因其具有快速、灵敏,仪器实用性更广的优点逐渐成为氨基酸检测的首要选择^[8]。目前常用的柱前衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)^[9,10]、茚甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)、异硫氰酸苯酯(PITC)^[11,12]、丹磺酰氯(Dansyl-Cl)和 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)等,以及一些合成的新型衍生试剂^[13,14],但无论是商品化的还是实验室合成的衍生试剂都有其各自的优缺点:OPA 衍生法速度迅速,但不能同时衍生一、二级氨基酸且衍生产物不稳

收稿日期:2013-11-25

修回日期:2014-06-19

* 国家自然科学基金面上项目(21177040) 基于分子印迹聚合物固相微萃取原亲水液相色谱分离的氨基糖苷类抗生素残留快速筛查技术研究,负责人 章飞芳。

** 通讯作者:章飞芳,副教授,硕士生导师,主要研究方向:药物分离分析方法。

定;Fmoc-Cl 衍生法速度较快,产物稳定,但试剂本身和水解产物会干扰分析;PITC 衍生法产物单一、稳定,但残余的衍生试剂对色谱柱会有损伤;Dansyl-Cl 衍生法产物稳定但反应活性差,速度较慢。因此发展一种低成本、灵敏、高效的检测方法显得尤为重要。本文选择 PITC 作为柱前衍生试剂,在衍生反应后用多次溶剂萃取法去除过量的衍生试剂,结合 HPLC-UV 分析方法,实现了 18 种氨基酸的分离,可为复方氨基酸注射液的氨基酸高效全分析提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪,配备在线脱气机、四元泵,自动进样器、柱温箱、2489 紫外检测器(美国 Waters 公司);KH5200B 超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水发生器(美国 Millipore 公司);QL-861 漩涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);0.22 μm 有机相针式滤器(上海安谱学仪器有限公司)。

甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、天门冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)、苏氨酸(Thr)、谷氨酸(Glu)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、酪氨酸(Tyr)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、胱氨酸(Cys)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)等氨基酸标准品(纯度 $\geq 95\%$),以及盐酸(HCl,纯度 $36\%\sim 38\%$)、乙酸(纯度 $\geq 99.5\%$)均购自上海凌峰化学试剂有限公司;甲酸(纯度 $\geq 99\%$)、三乙胺(TEA,纯度 $\geq 99\%$)、醋酸钠标准品(纯度 $\geq 99\%$)、正己烷、乙腈、甲醇(色谱纯试剂)均由北京百灵威科技有限公司提供;PITC 购自中国上海阿拉丁试剂公司。

1.2 衍生方法

1.2.1 衍生试剂配制

精密量取 25 μL PITC 和 140 μL TEA,分别用乙腈定容至 1 mL,配制成 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PITC-乙腈溶液和 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEA-乙腈溶液。

1.2.2 混合标准工作液及样品的衍生化

精密量取混合标准工作液和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液(空白对照)各 200 μL ,分别置于 1 mL 离心管中,加入 100 μL PITC-乙腈溶液和 TEA-乙腈溶液,涡旋,静置 1 h 后加入 400 μL 正己烷萃取,取下层

溶液 200 μL ,加入 800 μL 水,混匀待测。复方氨基酸注射液用 HCl 溶液稀释 10 倍后按上述方法制备。

1.3 色谱条件

色谱柱:华谱新创科技有限公司 Unitary C_{18} 柱(250 $\text{mm}\times 4.6\text{ mm}$, 5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:254 nm;进样量:5 μL ;流动相:A 相:50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液(用乙酸调节 pH 到 6.5),B 相:乙腈:甲醇:水=60:20:20(V/V/V),梯度洗脱程序:0~17 min,95%~76% A;17~22 min,76%~73% A;22~26 min,73%~65% A;26~35 min,65%~52% A;35~40 min,52%~10% A。

2 结果与分析

2.1 衍生条件的优化

本文考察了衍生试剂与样品浓度用量比,分别配制了与样品的浓度比为 1:1、1:1.5、1:2、1:2.5 的 PITC-乙腈溶液。结果发现,大多数氨基酸的峰面积在衍生化实际用量与样品浓度比为 1:2 时达到峰值,推测可能是过量的衍生化试剂导致副产物的出现,使衍生主产物的峰面积有所下降。故以衍生化试剂与样品浓度比为 1:2 为反应最佳配比。

此外,考察了衍生化反应时间对产物浓度的影响。采集在室温下衍生反应 20、50、60、90、120 min 的样品,按上述衍生操作后进行色谱分析。结果发现,反应 60 min 后氨基酸均已反应完全。

2.2 色谱条件的优化

流动相的 pH 值直接影响氨基酸的分离效果,本文考察了不同 pH 条件(4.3、4.5、5.5、6.0、6.5、7.3)对 18 种氨基酸的分离效果的影响。结果发现,pH ≤ 4.5 时,部分氨基酸不能分离。以 3 对难分离的氨基酸(Arg/Thr、Ala/Pro、Ile/Leu)为主要分离目标,发现随着 pH 从 5.5 增大到 7.3 时,Arg 与 Thr 的分离度逐渐变小,Ala 与 Pro 的分离度逐渐变大,Ile 与 Leu 的分离度变化不大。综合考虑,选择 pH 为 6.5。

考察了不同的醋酸钠缓冲液浓度(20、30、40、50、60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对氨基酸分离的影响。研究发现盐浓度对大多数氨基酸的保留时间影响不大。但由于氨基酸种类很多,保留时间稍有变动即会影响分离度,随着盐浓度的增大,Arg 与 Thr 的分离度增大,而 Ala 与 Pro 的分离度逐渐变小,Ile 与 Leu 的分离效果变化不大。综合考虑,选择盐浓度为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 方法学评价

2.3.1 方法重复性

在选定的条件下进行系统重复性实验,平行衍生化进样6次。结果RSD在0.07%~0.42%之间,表明系统适应性良好。

2.3.2 线性关系、检出限及定量限

18种氨基酸在 $9\sim 1\,021\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,相关系数大于0.99,定量限($S/N\geq 10$)、检测限($S/N\geq 3$)。结果见表1。

2.3.3 产物的稳定性

本文考察了衍生产物放置0、2、4、6、8、10、12、24、48、60 h后的稳定性情况。结果表明,日内RSD $\leq 3.1\%$,日间RSD $\leq 6.8\%$,其中胱氨酸(Cy2)稳定性较差,会逐步降解成半胱氨酸(Cys)以致

峰面积下降,RSD为14.2%。故样品当天配置当天测定。

2.3.4 实际样品回收率和精密度

将优化后的方法应用于复方氨基酸注射液的分析,样品用 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl溶液稀释10倍后进样,样品色谱图如图1,且本方法回收率等情况见表2,可以看出在3个浓度添加范围内,回收率为92.65%~110.72%,RSD为0.01%~5.68%,表明本方法具有较高的准确度和精密度,可以满足实际检测的需要。

2.4 实际样品的应用

应用建立的方法对购自4个不同厂家生产的复方氨基酸注射液的氨基酸含量进行测定,检测结果见表3。因为胱氨酸在复方氨基酸注射液中含量

表1 18种氨基酸的线性方程、线性范围、相关系数、定量限和检出限

氨基酸	线性方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	R^2	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Asp	$Y = 0.378\ 7\times 10^6 X - 0.041\ 3\times 10^6$	17~666	0.997 7	2.41	8.05
Glu	$Y = 0.374\ 6\times 10^6 X - 0.027\ 4\times 10^6$	18~736	0.999 4	4.02	13.41
Ser	$Y = 0.429\ 3\times 10^6 X - 0.013\ 2\times 10^6$	13~525	0.999 9	0.01	0.03
Gly	$Y = 0.414\ 3\times 10^6 X - 0.009\ 7\times 10^6$	9~375	0.999 9	0.01	0.02
His	$Y = 0.398\ 4\times 10^6 X - 0.017\ 0\times 10^6$	19~776	0.999 9	0.65	2.17
Arg	$Y = 0.399\ 1\times 10^6 X - 0.017\ 2\times 10^6$	22~871	0.999 9	1.81	6.04
Thr	$Y = 0.428\ 4\times 10^6 X - 0.017\ 8\times 10^6$	15~596	0.999 9	1.18	3.94
Ala	$Y = 0.450\ 0\times 10^6 X - 0.014\ 6\times 10^6$	11~445	0.999 9	0.83	2.76
Pro	$Y = 0.399\ 4\times 10^6 X - 0.007\ 9\times 10^6$	14~576	0.999 9	0.02	0.06
Tyr	$Y = 0.437\ 3\times 10^6 X - 0.010\ 7\times 10^6$	23~906	0.999 9	1.52	5.08
Val	$Y = 0.436\ 2\times 10^6 X - 0.007\ 4\times 10^6$	15~586	0.999 9	1.24	4.14
Met	$Y = 0.466\ 5\times 10^6 X - 0.014\ 7\times 10^6$	19~746	0.999 9	0.63	2.09
Cy2	$Y = 0.623\ 9\times 10^6 X - 0.042\ 8\times 10^6$	15~601	0.999 6	1.80	5.99
Ile	$Y = 0.414\ 8\times 10^6 X - 0.007\ 9\times 10^6$	16~656	0.999 9	0.84	2.80
Leu	$Y = 0.460\ 7\times 10^6 X - 0.008\ 7\times 10^6$	16~656	0.999 9	0.78	2.61
Phe	$Y = 0.443\ 8\times 10^6 X - 0.009\ 5\times 10^6$	21~826	0.999 9	1.06	3.55
Trp	$Y = 0.494\ 0\times 10^6 X - 0.013\ 8\times 10^6$	26~1 021	0.999 9	1.71	5.70
Lys	$Y = 0.578\ 8\times 10^6 X - 0.024\ 1\times 10^6$	18~731	0.999 9	2.42	8.08

表 2 实际样品中 18 种氨基酸的添加回收率与精密度($n=2$)

氨基酸	加入量/mM	回收率/%	RSD/%	氨基酸	加入量/mM	回收率/%	RSD/%
Asp	0.25	109.48	5.25	Tyr	0.25	108.55	2.21
	0.50	95.40	0.21		0.50	96.97	0.02
	1.00	102.77	0.17		1.00	100.52	0.01
Glu	0.25	109.47	2.00	Val	0.25	102.48	4.79
	0.50	97.65	0.25		0.50	93.54	0.99
	1.00	102.28	0.01		1.00	100.43	0.01
Ser	0.25	98.87	2.19	Met	0.25	109.30	2.19
	0.50	97.09	0.32		0.50	95.00	0.55
	1.00	101.07	0.01		1.00	101.44	0.01
Gly	0.25	105.27	3.76	Cy2	0.25	96.47	4.34
	0.50	100.24	2.27		0.50	102.72	1.23
	1.00	101.49	0.05		1.00	109.20	0.03
His	0.25	107.75	4.14	Ile	0.25	104.05	5.68
	0.50	98.26	0.65		0.50	95.65	0.12
	1.00	103.40	0.01		1.00	102.99	0.01
Arg	0.25	109.23	3.88	Leu	0.25	98.36	4.68
	0.50	95.27	0.78		0.50	95.42	0.91
	1.00	100.52	0.02		1.00	99.24	0.03
Thr	0.25	110.72	5.50	Phe	0.25	106.32	4.99
	0.50	98.26	0.75		0.50	97.13	166
	1.00	103.67	0.01		1.00	92.65	0.01
Ala	0.25	105.96	4.12	Trp	0.25	108.44	1.36
	0.50	97.14	1.13		0.50	97.02	0.34
	1.00	99.94	0.01		1.00	100.44	0.01
Pro	0.25	105.54	0.23	Lys	0.25	103.28	5.47
	0.50	95.64	1.44		0.50	94.26	2.12
	1.00	101.75	0.03		1.00	97.04	0.02

表 3 4 批复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

氨基酸	1	2	3	4	氨基酸	1	2	3	4
Asp	2.6	5.1	3.9	1.5	Tyr	0.3	0.6	0.4	0.2
Glu	0.8	1.8	6.2	0.7	Val	3.6	6.8	4.8	1.8
Ser	1.0	1.9	2.2	0.6	Met	2.1	4.0	3.6	1.2
Gly	7.3	13.5	10.6	3.8	Cy2	0.4	—	1.7	—
His	2.0	3.7	6.3	1.1	Ile	4.0	7.3	6.7	2.0
Arg	4.4	8.4	8.1	2.2	Leu	4.9	8.9	13.0	2.5
Thr	2.3	4.4	6.3	1.2	Phe	5.5	10.2	10.2	2.9
Ala	1.9	3.5	6.0	1.0	Trp	0.7	1.8	1.6	0.6
Pro	1.1	2.2	3.8	0.6	Lys	5.0	9.3	13.8	3.0

注：— 未检测出。

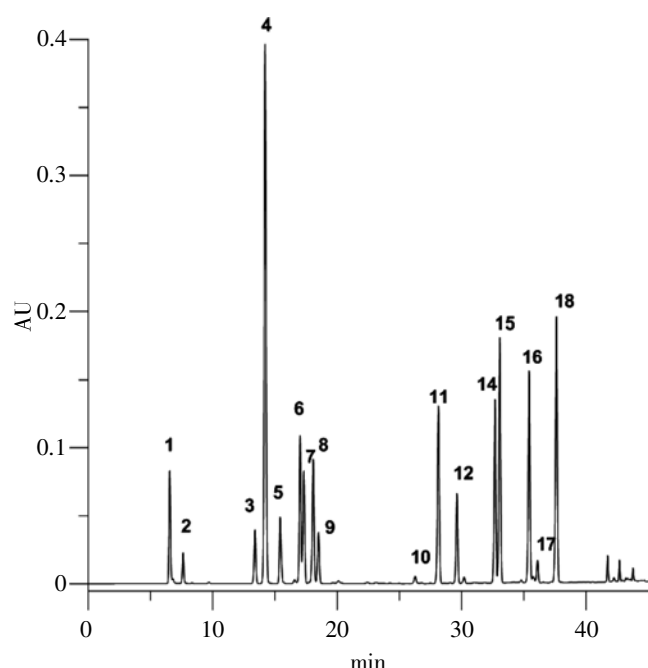


图1 复方氨基酸注射液样品的色谱图

注 1.Asp 2.Glu 3.Ser 4.Gly 5.His 6.Arg 7.Thr 8.Ala 9.Pro 10.Tyr , 11.Val 12.Met 13.Cy2(N.D) 14.Ile 15.Leu 16.Phe 17.Trp 18.Lys

均很低,且易转换成半胱氨酸,所以在部分样品中检测不到。

3 结论

本文建立了 PITC 柱前衍生测定复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量的 HPLC 分析方法。该方法成本低,线性关系好,线性范围宽,检出限、回收率和稳定性均可满足实际样品的检测要求,且具有较高的灵敏度,准确度,可以大范围推广适用于其他较复杂的基质中氨基酸的含量测定,具有较好的应用价值。

参考文献

1 谢小平,揭志刚,李映良,等.复方氨基酸注射液在老龄胃癌患者术后营养支持中的作用.中华外科杂志,2005,8(1):84~85.

- 2 李明,冯堃,张涛.复方氨基酸的合理选用.山东医药,2006,46(17):99~100.
- 3 纪宇.HPLC 法直接测定复方氨基酸注射液中的 6 种氨基酸.中国药品标准,2007,8(4):27~29.
- 4 Ilisz I, Aranyi A, Pataj Z, *et al.* Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2012, 69: 28~41.
- 5 Checa-Moreno R, Manzano E, Mirón G, *et al.* Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. *J Separat Sci*, 2008, 31(22):3817~3828.
- 6 Zhang L, Li Y, Zhou H, *et al.* Determination of eight amino acids in mice embryonic stem cells by pre-column derivatization HPLC with fluorescence detection. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2012, 66: 356~358.
- 7 Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, *et al.* Advances in amino acid analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(2):445~452.
- 8 邢健,李巧玲,耿涛华,等.氨基酸分析方法的研究进展.中国食品添加剂,2012(5):187~191.
- 9 Avino P, Campanella L, Russo M V. High-performance liquid chromatography intercomparative study for amino acid analysis in two tissues by PITC- and OPA-derivatizations. *Anal Lett*, 2001, 34(6): 867~882.
- 10 Zhao M, Ma Y, Dai L, *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of 21 free amino acids in tea. *Food Anal Methods*, 2013, 6(1):69~75.
- 11 Heinrikson R L, Meredith S C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal Biochem*, 1984, 136(1):65~74.
- 12 Wilson S F, James C A, Zhu X, *et al.* Development of a method for the determination of glycine in human cerebrospinal fluid using pre-column derivatization and LC-MS/MS. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2011, 56(2):315~323.
- 13 Gatti R, Gioia M G, Leoni A, *et al.* 2,5-Dimethyl-1H-pyrrole-3,4-dicarbaldehyde as a precolumn derivatization reagent for HPLC/UV detection of amino acids. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2010, 53(2):207~211.
- 14 Li W, Hou M, Cao Y, *et al.* Determination of 20 free amino acids in asparagus tin by high-performance liquid chromatographic method after pre-column derivatization. *Food Anal Methods*, 2012, 5(1):62~68.

Content Determination of 18 Amino Acids in Compound Amino Acid Injection by HPLC with Pre-column PITC Derivatization

Wang Yuan¹, Wang Hailong², Jin Gaowa³, Zhang Feifang¹, Yang Bingcheng¹, Liang Xinmiao^{1, 3}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Lyuliang University, Lvliang 033000, China;

3. *Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China*)

Abstract: An efficient and sensitive analytical method for the simultaneous content determination of 18 amino acids in compound amino acid injection was developed using high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization. Phenyl isothiocyanate (PITC) was used as derivatization reagent. The target compounds were separated on a Unitary-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) in gradient elution mode using sodium acetate and the mixture of acetonitrile, methanol and water as mobile phases. The detection wavelength was 254 nm. The derivatization reagent dosage, derivatization time, salt concentration, the pH and the column temperature of mobile phase were investigated. Finally, 18 amino acids were separated within 40 minutes. The method showed that the good linearity ($r^2 \geq 0.9977$) was at a range from 9 μg·mL⁻¹ to 1 021 μg·mL⁻¹. The recoveries ranged from 92.6% to 110.7%. And the relative standard deviations (RSD) ranged from 0.01% to 5.68%. The limits of quantification (LOQ, S/N = 10) ranged from 0.02 μg·mL⁻¹ to 13.41 μg·mL⁻¹. This method, which was simple, sensitive and accurate, can be applied for the content determination of amino acids in compound amino acid injections.

Keywords: Pre-column derivatization, phenyl isothiocyanate, high performance liquid chromatography, compound amino acid injection

(责任编辑:李沙沙 张志华,责任译审:汪 晶)