

DTDPA-PITC联合柱前衍生化HPLC法同时测定复方氨基酸注射液中18种氨基酸的含量

阚微娜*,滕艳坤,杨宏伟,隗笑(辽宁省食品药品检验所,沈阳 110023)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1122-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.23

摘要 目的:建立同时测定含有半胱氨酸或胱氨酸的复方氨基酸注射液中18种氨基酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法,以二硫代二丙酸(DTDPA)和异硫氰酸苯酯(PITC)联合作为柱前衍生化试剂。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相[A为0.1 mol/L醋酸盐缓冲液(pH 5.38)-乙腈(93:7, V/V)、B为乙腈-水(80:20, V/V),采用梯度洗脱],检测波长为254 nm,流速为1.0 ml/min,进样量为3 μl,柱温为35 ℃。结果:18种氨基酸在各自测定浓度的20%~180%的范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系($r \geq 0.999 0$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 1.91\%$;平均回收率在95.7%~99.7%之间,RSD $\leq 1.99\%$ ($n=9$)。结论:该方法准确、高效,实现了对复方氨基酸注射液中半胱氨酸以及其他17种氨基酸的准确定量。

关键词 二硫代二丙酸;异硫氰酸苯酯;柱前衍生化;高效液相色谱法;氨基酸;半胱氨酸

Simultaneous Determination of 18 Kinds of Amino Acids in Compound Amino Acid Injection by DTDPA-PITC Combined with Pre-column Derivatization HPLC

KAN Wei-na, TENG Yan-kun, YANG Hong-wei, KUI Xiao(Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of 18 kinds of amino acids in Compound amino acid injection including cysteine or cystine. METHODS: HPLC method was adopted. The samples were derived with 3,3'-dithiodipropionic acid (DTDPA) and phenylisothiocyanate (PITC). The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase A consisted of 0.1 mol/L acetate buffer (pH 5.38)-acetonitrile (93:7, V/V) and mobile phase B consisted of acetonitrile-water (80:20, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min (gradient elution) and the detection wavelength of 254 nm. The column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 3 μl. RESULTS: The linear range of 18 kinds of amino acids was 20%-180% ($r \geq 0.999 0$); RSDs of precision, stability and reproducible were $\leq 1.91\%$; average recoveries were 95.7%-99.7% (RSD $\leq 1.99\%$, $n=9$). CONCLUSIONS: The method can accurately and efficiently determine cysteine and other 17 kinds of amino acids in simultaneously.

KEYWORDS 3,3'-dithiodipropionic acid; Phenylisothiocyanate; Pre-column derivatization; HPLC; Amino acids; Cysteine

测定氨基酸含量方法很多,仅柱前衍生化测定氨基酸含量的方法就有近10种^[1]。最常见的柱前衍生化方法为异硫氰酸苯酯(PITC)法、6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)法、邻苯二醛和9-芴甲基氯甲酸甲酯(OPA-FMOC)联用法以及2,4-二硝基氟苯(DNFB)法。AQC法和OPA-FMOC法衍生化反应时间短,专属性较好,但衍生化试剂价格相对昂贵,衍生化产物不稳定,需要使用具备编程功能的自动进样器,将样品衍生化后立即进样,对仪器要求较高^[2-3]。DNFB法所用的衍生化试剂属易爆、剧毒物质,有强致癌性,且极易损坏色谱柱,同时易干扰丝氨酸的测定^[4]。PITC法与氨基酸和亚氨基酸均能反应,反应产物稳定,衍生化试剂价格低廉,是最具吸引力的氨基酸分析方法之一。

半胱氨酸是多种复方氨基酸注射液^[5-6]的主要成分之一,其不稳定,与胱氨酸可以相互转化,定量十分困难。很多复方氨基酸注射液的质量标准中并未对半胱氨酸的含量进行规定。Barkholt曾提出用二硫代二丙酸(DTDPA)将半胱氨酸和

胱氨酸氧化成同一特定的S-2-羧乙基硫代半胱氨酸(Cys-MPA),再对后者进行定量分析^[7]。本研究即采用DTDPA将半胱氨酸或胱氨酸氧化成为稳定的氨基酸复合物,再以PITC法进行柱前衍生化,通过优化衍生化反应影响因素,改善高效液相色谱(HPLC)条件,使之与其他氨基酸得到有效分离,从而同时测定复方氨基酸注射液中18种氨基酸的含量。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A高效液相色谱仪,包括二元泵、自动进样器、紫外检测器、柱温箱及LC-solution工作站(日本岛津公司);CP225D型电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

氨基酸对照品(含门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、盐酸赖氨酸,中国食品药品检定研究院,批号:140624-200805,谷氨酸质量分数为99.5%,甲硫氨酸质量分数为99.7%,其他氨基酸质量分数为100%);L-盐酸半胱氨酸对照品(美国Sigma公司,批号:

* 主管药师,硕士。研究方向:生化药物分析。电话:024-25425029。E-mail:kanweina@126.com

073K8421,质量分数≥98.0%);复方氨基酸注射液(18AA-IX,辽宁某企业提供,批号:130102、130103、130104);PITC(上海亭新化工厂,分析纯);DTDPA(美国安捷伦公司,分析纯);乙腈为色谱纯,冰醋酸、无水醋酸钠、硼酸为分析纯,试验用水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相A为0.1 mol/L醋酸盐缓冲液(pH 5.38)-乙腈(93:7, V/V),流动相B为乙腈-水(80:20, V/V),梯度洗脱程序见表1;检测波长:254 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:3 μl;柱温:35 ℃。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 The gradient elution mode

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0.0	99	1
5.0	99	1
13.0	95	5
23.5	90	10
24.5	80	20
35.0	70	30
40.0	25	75
45.0	25	75
45.1	0	100
50.0	0	100
50.1	100	0
60.0	100	0

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取各氨基酸对照品适量,用水溶解稀释制成含异亮氨酸0.75 mg/ml、亮氨酸1.0 mg/ml、盐酸赖氨酸0.62 mg/ml、甲硫氨酸0.50 mg/ml、苯丙氨酸0.50 mg/ml、苏氨酸0.25 mg/ml、色氨酸0.25 mg/ml、缬氨酸0.75 mg/ml、丙氨酸0.30 mg/ml、精氨酸0.30 mg/ml、门冬氨酸0.025 mg/ml、谷氨酸0.025 mg/ml、组氨酸0.25 mg/ml、脯氨酸0.20 mg/ml、丝氨酸0.10 mg/ml、酪氨酸0.05 mg/ml、甘氨酸0.15 mg/ml、半胱氨酸0.025 mg/ml的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取样品10 ml,加水稀释至100 ml,即得(其中氨基酸质量浓度与对照品溶液相同)。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按照复方氨基酸注射液(18AA-IX)的处方,称取亚硫酸氢钠2.5 g、冰醋酸7 mg,加水稀释至100 ml,即得。

2.3 衍生化方法

精密量取对照品溶液0.5 ml,精密加入10% DTDPA溶液(称取DTDPA 1 g,用0.4 mol/L硼酸缓冲液10 ml溶解,并用40%氢氧化钠溶液调pH至10.4)0.5 ml,于80 ℃水浴放置30 min,取出,精密加入0.2 mol/L PITC 乙腈溶液0.25 ml、1 mol/L三乙胺乙腈溶液0.25 ml,混匀,于40 ℃水浴放置60 min(供试品溶液和阴性对照溶液同法操作)。

2.4 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液适量,按“2.3”项下衍生化方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,阴性对照对氨基酸的测定

无干扰。各种氨基酸色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数以门冬氨酸计为7 694。

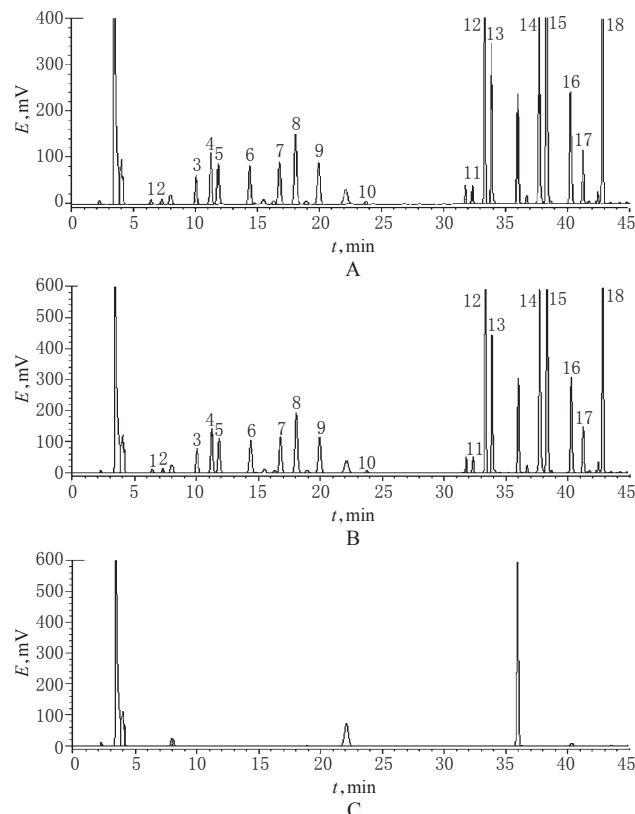


图1 DTDPA-PITC联合柱前衍生化高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.门冬氨酸;2.谷氨酸;3.丝氨酸;4.甘氨酸;5.组氨酸;6.精氨酸;7.苏氨酸;8.丙氨酸;9.脯氨酸;10.半胱氨酸;11.酪氨酸;12.缬氨酸;13.甲硫氨酸;14.异亮氨酸;15.亮氨酸;16.苯丙氨酸;17.色氨酸;18.赖氨酸

Fig 1 Chromatographs of 18 kinds of amino acids with pre-column DTDPA-PITC derivatization

A. substance control; B. test sample; C. negative control; 1. aspartic acid; 2. glutamic acid; 3. serine; 4. glycine; 5. histidine; 6. arginine; 7. threonine; 8. alanine; 9. proline; 10. cysteine; 11. tyrosine; 12. valine; 13. methionine; 14. isoleucine; 15. leucine; 16. phenylalanine; 17. tryptophan; 18. lysine

2.5 线性关系考察

精密称取各氨基酸对照品适量,用水溶解稀释,制成相当于“2.2.1”项下各氨基酸测定浓度的20%、60%、100%、140%和180%的系列溶液,按“2.3”项下方法衍生化,并按“2.1”项下色谱条件注入HPLC仪进样测定。以各组分峰面积(y)对其质量浓度(x, mg/L)进行线性回归,回归方程和线性范围见表2。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.3”项下方法衍生化后重复进样测定5次。结果,各氨基酸峰面积的RSD≤1.28%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一批号(20130102)样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.3”项下方法衍生化后进样测定。结果,各氨基酸峰面积的RSD≤1.91%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测组分	回归方程	线性范围,mg/L	r
门冬氨酸	$Y=5\ 292\ 510x-580$	4.96~44.64	0.999 8
谷氨酸	$Y=4\ 879\ 594x-347$	5.16~46.42	0.999 6
丝氨酸	$Y=7\ 404\ 557x-6\ 794$	21.48~193.32	0.999 7
甘氨酸	$Y=11\ 041\ 656x-21\ 854$	28.76~258.84	0.999 8
组氨酸	$Y=5\ 260\ 055x-17\ 921$	51.22~460.98	0.999 3
精氨酸	$Y=4\ 642\ 104x-67\ 376$	62.06~558.54	0.999 6
苏氨酸	$Y=6\ 150\ 931x-55\ 953$	51.24~461.16	0.999 2
丙氨酸	$Y=9\ 184\ 984x-84\ 315$	61.26~551.34	0.999 5
半胱氨酸	$Y=5\ 484\ 710x-13\ 966$	5.18~46.62	0.999 0
脯氨酸	$Y=7\ 924\ 694x-47\ 551$	43.24~389.16	0.999 7
酪氨酸	$Y=5\ 281\ 028x-1\ 315$	10.26~92.34	0.999 9
缬氨酸	$Y=7\ 508\ 303x-140\ 108$	150.48~1\ 354.32	0.999 5
甲硫氨酸	$Y=6\ 888\ 117x-82\ 396$	100.22~901.98	0.999 2
异亮氨酸	$Y=5\ 995\ 239x-85\ 576$	152.60~1\ 373.40	0.999 5
亮氨酸	$Y=6\ 830\ 412x-142\ 647$	203.54~1\ 831.86	0.999 5
苯丙氨酸	$Y=5\ 519\ 204x+75\ 859$	103.84~934.56	0.999 4
色氨酸	$Y=5\ 133\ 842x-13\ 628$	50.33~452.95	0.999 5
醋酸赖氨酸(以盐酸赖氨酸折算)	$Y=8\ 217\ 308x-232\ 458$	141.60~1\ 274.40	0.999 3

2.8 重复性试验

取同一批号(20130102)样品适量,分别按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别按“2.3”项下方法衍生化后进样测定。结果,各氨基酸平均含量为94.0%~103.2%,RSD为0.82%~1.62%,表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验

根据复方氨基酸注射液(18AA-IX)的处方,按“2.2.2”项下供试品溶液中各氨基酸测定浓度的80%、100%和120%制备回收率试验用系列溶液,每个浓度各3份,按“2.3”项下方法衍生化后再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率及RSD,结果见表3(注:由于数据量较大,每种氨基酸的加入量及测得量不在表中一一列出)。

表3 回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

待测组分	平均回收率,%	RSD,%
门冬氨酸	97.4	1.49
谷氨酸	98.1	1.06
丝氨酸	99.0	1.13
甘氨酸	98.9	1.53
组氨酸	98.7	1.72
精氨酸	98.9	1.95
苏氨酸	99.8	1.66
丙氨酸	99.3	1.09
半胱氨酸	95.7	1.91
脯氨酸	98.3	1.23
酪氨酸	98.8	0.68
缬氨酸	99.1	1.16
甲硫氨酸	99.4	1.33
异亮氨酸	99.7	1.88
亮氨酸	99.3	1.35
苯丙氨酸	99.9	1.99
色氨酸	97.6	1.34
醋酸赖氨酸	99.0	1.92

2.10 样品含量测定

分别取3批样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按

“2.3”项下方法衍生化后再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算各氨基酸含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(n=2)

Tab 4 Content determination of samples(n=2)

待测组分	含量,%		
	130102	130103	130104
门冬氨酸	95.5	100.6	99.2
谷氨酸	95.7	97.7	98.9
丝氨酸	98.2	100.6	100.4
甘氨酸	101.6	101.0	100.7
组氨酸	98.3	98.2	99.5
精氨酸	97.5	100.4	101.2
苏氨酸	100.2	101.4	103.6
丙氨酸	102.3	102.6	104.4
半胱氨酸	97.8	99.6	99.1
脯氨酸	101.5	100.8	100.1
酪氨酸	99.0	99.4	100.7
缬氨酸	96.5	97.4	99.4
甲硫氨酸	103.2	103.2	105.3
异亮氨酸	94.0	94.7	96.1
亮氨酸	98.4	98.9	100.7
苯丙氨酸	98.2	98.4	99.7
色氨酸	98.7	99.4	99.2
醋酸赖氨酸	97.8	98.1	100.2

3 讨论

3.1 流动相A中醋酸盐缓冲液的pH及浓度对氨基酸分析的影响

PITC法使用的流动相A中醋酸盐缓冲液pH为6.5,在此pH下,半胱氨酸同DTDPA的氧化产物Cys-MPA与精氨酸峰位重合,通过调节流动相梯度,也无法使二者实现较好的分离。故试验将流动相A中醋酸盐缓冲液的pH分别调节到6.01、5.72、5.49、5.43、5.38和5.30后,对各氨基酸峰及与Cys-MPA峰之间的分离度进行了考察。结果,当pH为5.38时,各氨基酸峰及与Cys-MPA峰之间的分离度良好,分离度均大于1.5。因此,流动相A中醋酸盐缓冲液的pH应严格控制在 5.38 ± 0.02 ,否则Cys-MPA与其他组分或衍生试剂峰无法实现基线分离。此外,流动相A中醋酸盐缓冲液的浓度也会影响各组分的分离度,因此在配制过程中也需要准确控制。

3.2 DTDPA对氨基酸分析的影响

取两份混合对照溶液各0.5 ml,第1份加10% DTDPA溶液0.5 ml,第2份加水0.5 ml,前者于80℃水浴放置30 min取出后,采用PITC法衍生化,后者直接采用PITC法衍生,比较除半胱氨酸外其他各氨基酸测定的峰面积及保留时间。结果,DTDPA的加入对其他氨基酸的测定基本没有影响。DTDPA反应结束加入PITC试剂后,溶液分层,振摇混匀后会出现轻微的混浊或有油滴出现,待到衍生化反应完全,溶液即会澄清,因此溶液澄清与否可以作为衍生化反应是否完全的一个判断依据。

3.3 PITC浓度及反应温度的影响

PITC乙腈溶液的浓度高于0.2 mol/L,衍生化反应的温度高于40℃,并不会对氨基酸的响应值有显著的影响,但得到的测定溶液的颜色却加深明显,推测可能有更多的衍生化副产物生成。因此,PITC法的衍生化试剂浓度及反应温度应尽量

HPLC法测定丹栀逍遥散中栀子苷的含量

姜 勇*(四川资中县人民医院,四川 资中 641200)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)12-1125-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.12.24

摘要 目的:建立测定丹栀逍遥散中栀子苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent TC-C₁₈,流动相为乙腈-水(15:85, V/V),检测波长为238 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:栀子苷检测质量浓度在0.51~16.32 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9995$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤2.30%;平均加样回收率为99.40%,RSD=1.99%($n=9$)。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于丹栀逍遥散中栀子苷的含量测定。

关键词 丹栀逍遥散;栀子苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Geniposide in Danzhi Xiaoyao Powder by HPLC

JIANG Yong(Zizhong County People's Hospital of Sichuan Province, Sichuan Zizhong 641200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of geniposide in Danzhi xiaoyao powder. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent TC-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (15:85, V/C) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 238 nm and the column temperature was set at 30 ℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of geniposide was 0.51-16.32 μg/ml ($r=0.9995$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.30%; average recovery was 99.40% (RSD=1.99%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for content determination of jasminoidin in Danzhi xiaoyao powder.

KEYWORDS Danzhi xiaoyao powder; Geniposide; HPLC; Content determination

丹栀逍遥散又叫八味道逍遥散,是调和肝脾剂,出自《内科摘要》,是在《太平惠民和剂局方》中所载的“逍遥散”的基础上加丹皮、栀子二药制成,具有疏肝解郁、健脾和营、兼清郁热之功效^[1-2]。主要用于肝郁血虚、内有郁热证,如潮热晡热、烦躁

易怒,或自汗盗汗,或头痛目涩,或颊赤口干,或月经不调、少腹胀痛,或小便涩痛、舌红苔薄黄、脉弦虚数等^[3-5]。目前,关于丹栀逍遥散中栀子苷含量测定的报道较少,故笔者参考相关文献^[6-14],采用高效液相色谱(HPLC)法对其中栀子苷的含量进

严格控制。

3.4 色谱柱的保护

PITC法衍生化试剂会使色谱柱填料过早老化,连续使用会导致柱效下降显著。故使用时,可在上柱前增加一根具有C₁₈填料的预柱,以延长色谱柱的使用寿命。

3.5 其他

半胱氨酸的水溶液极其不稳定,一般需要使用强氧化剂将其氧化为稳定的化合物后再进行定量测定。目前,半胱氨酸多使用过甲酸将其氧化为磺基丙氨酸后再用氨基酸分析仪进行分析。但是,氨基酸分析仪用途单一,仪器和耗材的价格昂贵,不适用于企业质控^[8]。本研究采用DTDPA为氧化剂,与PITC联合作为柱前衍生化试剂使用,不但可以准确测定产品中半胱氨酸的含量,且不影响其他氨基酸的测定,为企业质控带来方便,也可为复方氨基酸注射液质量标准的提高提供新途径。

参考文献

[1] 美国药典委员会.美国药典:34版[S].华盛顿:美国药典委员会,2012:568-573.

- [2] 陆明,孙黛妮,汪杨,等.OPA-FMOC联用柱前衍生化法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2012,32(6):1085.
- [3] 陈宇堃,梁蔚阳,薛巧如,等.AccQ-Tag法测定复方氨基酸注射液(18AA-V))中17种氨基酸的含量[J].广东药学院学报,2008,24(2):243.
- [4] 瞿其曙,汤晓庆,胡效亚,等.柱前衍生化法在氨基酸分析测定中的应用[J].化工进展,2006,18(6):789.
- [5] 国家食品药品监督管理局.复方氨基酸注射液(18AA-IX):WS1-XG-022-2011[S].2011.
- [6] 国家食品药品监督管理局.复方氨基酸注射液(18AA-VII):YBH02452010[S].2010.
- [7] 夏苏捷,邵泓,陈钢.柱前衍生化HPLC法测定酱油中(半)胱氨酸的含量[J].中国食品卫生杂志,2008,20(4):304.
- [8] 阙微娜,王沪凯.高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液(9AA)中抗氧剂的含量[J].中国生化药物杂志,2012,33(6):833.

(收稿日期:2013-05-10 修回日期:2014-02-07)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0832-5526282。E-mail:jjyy9941370@163.com