

柱前衍生 RP-HPLC 测定仙灵骨葆胶囊中 16 种氨基酸

杨卫灵¹, 李朝婵¹, 田红红², 谭高好¹, 柳立伟¹, 伍庆^{1*}

(1. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001;
2. 贵州师范大学生命科学院, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:建立柱前衍生 RP-HPLC 同时测定仙灵骨葆胶囊中 16 种氨基酸的方法。方法:以正亮氨酸为内标物,异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生剂,用高效液相色谱测定仙灵骨葆胶囊中水解氨基酸的量。采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸钠溶液-乙酸(7:93:0.05)为流动相 A,乙腈-水(80:20)为流动相 B 进行梯度洗脱,体积流量 1 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 40 ℃。结果:33 min 内可完成仙灵骨葆胶囊中 16 种氨基酸的分离测定,线性关系良好($r > 0.9968$),回收率 97.5% ~ 100.7%, RSD < 5%。结论:该方法简便快速、准确可靠,可用于仙灵骨葆胶囊中氨基酸的含量测定。

[关键词] 仙灵骨葆胶囊; 柱前衍生; 氨基酸; 异硫氰酸苯酯; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0044-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180044

Determination of 16 Amino Acids in Xianling Gubao Capsule by RP-HPLC with Pre-column Derivatization

YANG Wei-ling¹, LI Chao-chan¹, TIAN Hong-hong², TAN Gao-hao¹, LIU Li-wei¹, WU Qing^{1*} (1. Key Laboratory for Mountainous Area Information System and Ecological Environment Protection of Guizhou Province, Guiyang 550001, China; 2. Department of Biotechnology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a RP-HPLC method for the simultaneous determination of 16 amino acids in Xianling Gubao capsule. **Method:** With norleucine as the internal standard, hydrolyzed amino acids of Xianling Gubao capsule were derivatized with phenylisothiocyanate (PITC) and determined by RP-HPLC. Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was eluted with mobile phase A acetonitrile-0.1 mol·L⁻¹ sodium acetate solution-acetic acid (7:93:0.05) and mobile phase B acetonitrile-water (80:20) in a gradient mode at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was 40 ℃. **Result:** The 16 amino acids were separated within 33 min with a good linearity ($r > 0.9968$) within the range of the test concentration. The average recoveries ranged between 97.5% and 100.7% and the RSD values were less than 5%. **Conclusion:** The method is simple, quick, accurate and reliable and can be used for the determination of amino acids in Xianling Gubao capsule.

[Key words] Xianling Gubao capsule; pre-column derivation; amino acids; phenylisothiocyanate; HPLC

仙灵骨葆胶囊由淫羊藿、补骨脂等 6 味中药组成,具有补肾壮骨功效,临床广泛用于治疗骨质疏松症,疗效确切^[1]。目前关于该药的活性物质如淫羊藿苷、朝藿定 C 和补骨脂素等的研究报道较多^[2-4],

而有关氨基酸方面的研究较少。氨基酸在体内合成蛋白质,蛋白质与骨组织的形成和质量密切相关^[5-8],患者服用仙灵骨葆胶囊能额外补充氨基酸,起到辅助治疗作用;此外,明确该药氨基酸的含量与

[收稿日期] 20141107(003)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B04-01)

[第一作者] 杨卫灵,在读硕士,从事分析化学研究,Tel:15285977273,E-mail:yangwl0851@163.com

[通讯作者] *伍庆,教授,硕士生导师,从事分析化学研究,Tel:13984029735,E-mail:wq0851@163.com

种类后,可为仙灵骨葆胶囊药理、药效学的进一步研究提供一定的理论依据。本实验采用异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生剂,RP-HPLC 法测定仙灵骨葆胶囊中的氨基酸含量,为仙灵骨葆胶囊氨基酸测定提供一种科学有效的方法。

1 仪器与试剂

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SK-1 型快速混匀器(金坛市医药仪器厂),AL-204 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多),N-1001 型旋转蒸发仪(日本 Elyea)。

天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),丝氨酸(Ser),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),精氨酸(Arg),苏氨酸(Thr),丙氨酸(Ala),脯氨酸(Pro),酪氨酸(Tyr),缬氨酸(Val),蛋氨酸(Met),异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),苯丙氨酸(Phe),赖氨酸(Lys)对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司);正亮氨酸(Nle),PITC 衍生剂,三乙胺(Bonna-Agela Technologies 公司)。仙灵骨葆胶囊为市售(批号 101201,101202,101207,贵州同济堂制药有限公司),乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

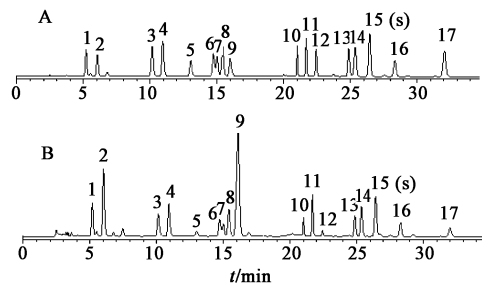
2.1 混合对照品储备液的制备 分别精密称取各氨基酸对照品适量,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液制成每 1 mL 含天冬氨酸 1.007 mg,谷氨酸 1.073 mg,丝氨酸 0.794 mg,甘氨酸 0.694 mg,组氨酸 0.740 mg,精氨酸 0.973 mg,苏氨酸 0.757 mg,丙氨酸 0.744 mg,脯氨酸 1.154 mg,酪氨酸 0.687 mg,缬氨酸 0.707 mg,蛋氨酸 0.734 mg,异亮氨酸 1.057 mg,亮氨酸 0.790 mg,苯丙氨酸 0.684 mg,赖氨酸 0.724 mg 的混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备 取仙灵骨葆胶囊内容物约 0.1 g,精密称定,置聚四氟乙烯水解罐中,精密加入 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液(含 0.1% 苯酚)5 mL,于恒温烘箱中 110 °C 水解 24 h,取出冷却,过滤于 25 mL 量瓶中,用纯净水洗涤滤渣并定容至刻度。将溶液于旋转蒸发仪上 65 °C 浓缩,用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶解,将溶液转入 10 mL 量瓶中,定容,即得。

2.3 衍生化反应 分别准确移取对照品溶液、供试品溶液各 200 μL,置 1.5 mL 离心管中,准确加入 1.0 g·L⁻¹ 正亮氨酸溶液 20 μL,再加入 0.1 mol·L⁻¹ 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100 μL,1 mol·L⁻¹ 三乙胺乙腈溶液 100 μL,混匀,室温放置 1 h,加入正己烷 400 μL,快速混匀器振荡混匀后,静置 10 min,用注射器吸取下层溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤后进样进行色

谱分析。

2.4 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),进样量 2 μL,体积流量 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,检测波长 254 nm;流动相 A 为乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液-乙酸(7:93:0.05),流动相 B 为乙腈-水(80:20),梯度洗脱程序(3 ~ 15 min,0 ~ 12% B;15 ~ 16 min,12% ~ 24% B;16 ~ 31 min,24% ~ 30% B;31 ~ 32 min,30% ~ 60% B;32 ~ 40 min,60% ~ 80% B)。见图 1。



1. 天冬氨酸;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. 酪氨酸;11. 缬氨酸;12. 蛋氨酸;13. 异亮氨酸;14. 亮氨酸;15. 正亮氨酸(内标);16. 苯丙氨酸;17. 赖氨酸。

图 1 仙灵骨葆胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Xianling Gubao capsule

2.5 线性关系考察、检出限 分别精密量取氨基酸混合对照品储备液 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。按 2.3 项下方法进行氨基酸对照品衍生化,按 2.4 项下色谱条件进样,测定峰面积。以各氨基酸实际质量浓度 X(mg·L⁻¹) 为横坐标,各种氨基酸峰面积与正亮氨酸峰面积比值 Y 为纵坐标,进行线性回归,得到的线性回归方程,以信噪比 S/N = 3 计算最小检出限,结果见表 1。

2.6 精密度试验 精密吸取氨基酸对照品溶液,按 2.3 项下方法进行衍生化,按 2.4 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。16 种氨基酸峰面积与内标峰面积比值的 RSD 均 < 1%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取批号为 101201 的样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,16 种氨基酸峰面积的 RSD 均 < 3%。

2.8 重复性试验 取批号为 101201 的样品,按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,进行衍生化反应,按 2.4 项下色谱条件进样测定,16 种氨基

表 1 16 种氨基酸的线性范围及检测限

Table 1 Linearity relationship and limit of detection of 16 amino acids

氨基酸	线性范围/mg·L ⁻¹	回归方程	相关系数	检测限/ng
Asp	20.14 ~ 302.1	$Y = 0.010\ 5X - 0.002\ 4$	0.999 7	1.342
Glu	21.46 ~ 321.9	$Y = 0.009\ 9X + 0.004\ 5$	0.999 8	1.192
Ser	15.88 ~ 238.2	$Y = 0.015\ 6X + 0.010\ 4$	0.999 4	1.058
Gly	13.88 ~ 208.2	$Y = 0.021\ 6X + 0.014$	0.999 2	0.924
His	14.80 ~ 222.0	$Y = 0.010\ 5X + 0.003\ 6$	0.999 2	0.987
Arg	19.46 ~ 291.9	$Y = 0.010\ 4X + 0.008\ 3$	0.999 4	1.298
Thr	15.14 ~ 227.1	$Y = 0.012\ 4X + 0.009\ 4$	0.999 0	1.009
Ala	14.88 ~ 223.2	$Y = 0.018\ 7X + 0.009\ 7$	0.999 2	0.991
Pro	23.08 ~ 346.2	$Y = 0.013\ 2X + 0.014\ 9$	0.999 5	0.769
Tyr	13.74 ~ 206.1	$Y = 0.010\ 4X + 0.008\ 1$	0.999 0	0.915
Val	14.14 ~ 212.1	$Y = 0.014\ 6X + 0.006\ 3$	0.999 2	0.942
Met	14.68 ~ 220.2	$Y = 0.012\ 1X + 0.017\ 3$	0.999 4	0.977
Ile	21.14 ~ 317.1	$Y = 0.009\ 8X + 0.056\ 2$	0.998 4	1.053
Leu	15.80 ~ 237.0	$Y = 0.012\ 9X - 0.007\ 6$	0.996 8	0.912
Phe	13.68 ~ 205.2	$Y = 0.011\ 6X + 0.009\ 4$	0.998 8	0.965
Lys	14.48 ~ 217.2	$Y = 0.021\ 7X + 0.010\ 3$	0.999 3	1.117

酸峰面积的 RSD 均 < 3%。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的仙灵骨葆胶囊(批号 101201)内容物 9 份,每份约 0.05 g,按其中各成分质量分数的高(120%),中(100%),低(80%)3 个水平加入氨基酸对照品,按 2.2 项下方法制备溶液,衍生化反应,按上述色谱条件进样测定,计算回收率。结果表明,天冬氨酸(Asp),谷氨酸(Glu),丝氨酸(Ser),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),精氨酸(Arg),苏氨酸(Thr),丙氨酸(Ala),脯氨酸(Pro),酪氨酸(Tyr),缬氨酸(Val),蛋氨酸(Met),异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),苯丙氨酸(Phe),赖氨酸(Lys)的平均回收率分别为 99.3%, 97.7%, 98.7%, 99.4%, 99.1%, 99.4%, 98.3%, 98.9%, 100.7%, 98.8%, 98.0%, 98.8%, 97.9%, 97.5%, 99.2%, 99.4%, RSD 分别为 1.2%, 1.7%, 3.1%, 3.1%, 2.4%, 2.6%, 2.8%, 3.2%, 1.8%, 1.9%, 1.6%, 2.2%, 1.4%, 1.2%, 1.4%, 2.2%。

2.10 样品测定 取 3 批样品(批号 101201, 101202, 101217),每批 2 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进行衍生化,进样测定,以内标法计算氨基酸的含量(mg·g⁻¹),结果见表 2。

3 讨论

3.1 衍生化 pH 考察 异硫氰酸苯酯与氨基酸的反应属于亲核加成反应,氨基作为亲核试剂进攻异

表 2 3 批仙灵骨葆胶囊中 16 种氨基酸的测定(n=3)

Table 2 Contents of 16 amino acids in three batches of Xianling Gubao capsula (n=3) mg·g⁻¹

氨基酸	质量分数		
	批号 101201	批号 101202	批号 101207
Asp	13.85	12.53	13.12
Glu	29.93	28.22	27.11
Ser	6.53	7.78	5.87
Gly	6.66	7.42	7.13
His	2.64	3.11	2.96
Arg	7.97	6.54	7.54
Thr	4.85	5.28	5.11
Ala	7.16	7.02	6.78
Pro	30.12	29.54	28.12
Tyr	5.98	6.63	6.13
Val	8.38	7.88	8.25
Met	18.86	19.15	18.12
Ile	6.37	5.86	6.11
Leu	5.96	6.52	6.98
Phe	6.52	5.98	5.13
Lys	3.03	3.62	3.97

硫氰酸苯酯碳氮双键中的碳原子。亲核加成反应用酸催化和碱催化皆可,可是在此反应中,酸催化虽然

增加了碳原子的亲电性而利于加成,但同时质子与氨基结合使它的亲核性大大降低,导致亲核加成反应不能顺利进行。在碱催化下,氨基氮原子的未共用电子对裸露出来,增强了亲核性,使亲核加成反应效率提高。综合考虑色谱柱的pH承受范围在2~9,最终选择的衍生化反应的pH为8.0。

3.2 流动相考察 衍生化后的氨基酸处于碱性环境,溶液中负离子较多,流动相调成酸性后正离子量会增加,使正离子与负离子的量相等,其极性就会降低,有利于氨基酸在柱子中的保留行为。A相分别考察了0.1%乙酸,0.05%乙酸,0.05%甲酸,0.1 mol·L⁻¹乙酸钠溶液-乙酸(100:0.05),乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸钠溶液-乙酸(7:93:0.05)体系,结果表明,乙酸钠-乙酸缓冲体系中加入乙腈以后,峰的分度度和峰形变好,故选择乙腈-0.1 mol·L⁻¹乙酸钠溶液-乙酸(7:93:0.05)体系作为流动相A。

明确仙灵骨葆胶囊中氨基酸含量和种类,以期对仙灵骨葆胶囊的药理学、药效学、蛋白组学进行下一步研究,使人们更加清楚骨骼疾病的发病机制和治疗机制,从而寻找骨骼疾病治疗的新方法。

[参考文献]

[1] Zhu H M, Qin L, Garner P, et al. The first multicenter and randomized clinical trial of herbal Fufang for treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Bone,

2010, 47(3):457-458.

[2] 周岚,乙引,伍庆,等. HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定C淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素 [J]. 中草药, 2011, 42(10):1998-2000.

[3] 王玉萍,郭宝林. 仙灵骨葆胶囊中总黄酮及淫羊藿苷的含量测定 [J]. 中草药, 2000, 31(10):741-742.

[4] 李晓龙,梁光义,曹佩雪,等. HPLC同时测定仙灵骨葆胶囊中朝藿定B、朝藿定C和淫羊藿苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5):891-893.

[5] 黄连芳,李青南,林柏云. 低蛋白饲料对雄性大鼠胫骨上段和腰椎的骨计量学研究 [J]. 解剖学研究, 2005, 27(1):40-41.

[6] Yuna Zhong M D, M S P H, Catherine A. Association of total calcium and dietary protein intakes with fracture risk in post menopausal women: The 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) [J]. Nutrition, 2009, 25(6):647-651.

[7] Schurch M A, Rizzoli R, Slosman D, et al. Protein supplements increase serum insulin like growth factor-1 levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture [J]. Ann Int Med, 1998, 128(10):801-809.

[8] Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, et al. Serum levels of insulin like growth factor (IGF)-1, IGF-binding protein (IGFBP)-2 and IGF-BP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures [J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(8):1272-1279.

[责任编辑 顾雪竹]