

## 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定 阿胶中的 17 种未衍生氨基酸

鄢 丹<sup>1,2</sup>, 韩玉梅<sup>1,2</sup>, 董小萍<sup>2</sup>

(1. 解放军 302 医院中医研究所, 北京 100039; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611730)

**摘要** :建立了反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)同时测定中药阿胶中 17 种未衍生氨基酸含量的方法。采用 Prevail™ C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm),以乙腈-0.7% 三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol/L 七氟丁酸)为流动相进行线性梯度洗脱,流速为 0.8 mL/min,在漂移管温度 115 °C、氮气流量 2.5 L/min 条件下,在 25 min 内即可完成对阿胶中 17 种氨基酸的分离测定。氨基酸质量浓度为 0.073 ~ 2.327 g/L 时,其峰面积的对数值与质量浓度的对数值线性关系良好;17 种氨基酸的加样回收率为 93.5% ~ 104.8%;信噪比为 3 时,测得氨基酸的最低检测限介于 18.2 mg/L 与 54.6 mg/L 之间。该法快速、简便、准确,可作为阿胶中氨基酸的直接测定方法,亦为其他药物中氨基酸的分析提供了参考。

**关键词** :反相高效液相色谱;蒸发光散射检测;未衍生化;氨基酸;阿胶

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)04-0359-04 栏目类别 :研究论文

## Simultaneous Determination of 17 Underivatized Amino Acids in Donkey-Hide Glue by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography-Evaporative Light-Scattering Detection

YAN Dan<sup>1,2</sup>, HAN Yumei<sup>1,2</sup>, DONG Xiaoping<sup>2</sup>

(1. Institute of Chinese Medicine, 302 Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100039, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**Abstract** : An analytical method to determine 17 underivatized amino acids in donkey-hide glue was established with reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with evaporative light-scattering detection (ELSD). A Prevail™ C<sub>18</sub> column was used with the mobile phase of acetonitrile-0.7% trifluoroacetic acid containing 5.0 mmol/L heptafluorobutyric acid. Under the condition of solvent gradient elution, the temperature of drift tube was 115 °C and the gas flow rate was 2.5 L/min. The 17 amino acids were separated within 25 min. The good linearities between the logarithm of peak area and logarithm of mass concentration of amino acids were obtained in a range of mass concentrations from 0.073 g/L to 2.327 g/L. The recoveries of 17 amino acids were 93.5% - 104.8% with the relative standard deviations (RSDs) of 0.58% - 2.88%. The lowest detection limits of amino acids were from 18.2 mg/L to 54.6 mg/L with 3 times the signal to noise ratio. This HPLC-ELSD method is rapid, simple and accurate. It can be used for the direct determination of 17 underivatized amino acids in donkey-hide glue. It also serves as a good reference for the determination of amino acids in other fields, such as pharmaceutical analysis.

**Key words** : reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); evaporative light-scattering detection (ELSD); underivatized; amino acid; donkey-hide glue

中药阿胶为马科动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶,具有补血滋阴、润燥、止血之功效<sup>[1]</sup>,其主要有效成分为胶原蛋白、氨基酸、微量元素等<sup>[2]</sup>。2005 年版中国药典仅对其中甘氨酸的定性鉴别和挥发性碱性物质及总氮

的含量有要求,未收载其他氨基酸种类及其量化评价方法;而阿胶中氨基酸种类或(和)含量不同,其生理活性的作用及强度亦有差异<sup>[3]</sup>。因此,建立阿胶中有效成分氨基酸的快速、准确、直接的测定方法,对进一步评价阿胶药材及其制剂的内在质量有

积极意义。

对于氨基酸的测定,多采用氨基酸自动测定仪、衍生化反相高效液相色谱法等<sup>[4]</sup>。前者存在仪器复杂、体积大、费用高等不足,后者需要对衍生化试剂、衍生化反应条件及产物的稳定性等进行相应的考察,不利于直接、快速地测定氨基酸。本研究采用高效液相色谱(HPLC)-蒸发光散射检测法(ELSD)对阿胶中未衍生的氨基酸进行了直接测定。该法快速、简便、准确,具有足够的灵敏度,结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Alltech 高效液相色谱仪,426 型二元梯度泵,2000 ES 型蒸发光散射检测器,Alltech 色谱工作站(美国奥泰科技(中国)有限公司);BS 210S 型电子天平(北京 Sartorius 有限公司)。氨基酸标准品:丝氨酸(Ser)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甲硫氨酸(Met)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和半胱氨酸(Cys)(纯度均大于 99.0%,Sigma 公司)。三氟醋酸(TFA)(色谱纯,Sigma 公司),乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),七氟丁酸(纯度大于 98%,Sigma 公司),水为二次蒸馏水。阿胶药材为驴的干燥皮制成的固体胶(经四川大学华西医学中心鉴定,批号 20050401,20050402,20050403)。

### 1.2 标准品混合溶液和供试品溶液的制备

分别精密称取组氨酸等 17 种氨基酸标准品适量置于同一量瓶中,加 0.01 mol/L 盐酸溶解配制成各氨基酸浓度均约为 2.327 g/L 的标准品混合溶液。精密称取阿胶粗粉 50 mg 置于锥形瓶中,加入 6 mol/L 盐酸 20 mL,抽真空密封,恒温 110 °C 水解 24 h,放冷,滤过,挥干滤液,加水 2.5 mL 溶解,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

### 1.3 色谱条件

Prevail™ C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm,250 mm × 4.6 mm i. d.)。流动相:A,乙腈;B,0.7% 三氟醋酸溶液(含 5.0 mmol/L 七氟丁酸);线性梯度洗脱程序:0 ~ 5 min 0%A,8 min 时升至 15%A,25 min 时升至 35%A,流速 0.8 mL/min。漂移管温度 115 °C;氮气流量 2.5 L/min;柱温 35 °C;进样量 10 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水解条件的选择

精密称取阿胶粗粉各 50 mg 置于锥形瓶中,分

别加入 20 mL 5 mol/L、6 mol/L 和 7 mol/L 盐酸,抽真空密封,于恒温 110 °C 下分别水解 18 h、24 h 和 30 h,放冷,过滤,挥干滤液,加水 2.5 mL 溶解,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液,在上述液相色谱条件下进样测定,结果见表 1。结果显示,在较低浓度盐酸(5 mol/L)、较短水解时间(18 h)时水解不完全,氨基酸总量偏低;在较高浓度盐酸(7 mol/L)、较长水解时间(30 h)时,氨基酸总量也有所降低,可能是水解条件过于剧烈导致部分氨基酸结构被破坏。因此,将水解条件确定为恒温 110 °C 下用 6 mol/L 盐酸水解 24 h。

表 1 不同水解条件对氨基酸测定结果的影响

Table 1 Influence of different hydrolysis conditions on the determination results of the amino acids

$\alpha(\text{HCl})(\text{mol/L})$	$w(\text{Total amino acids})/\%$		
	18 h	24 h	30 h
5	38.08	41.97	41.52
6	43.65	55.59	46.27
7	42.21	43.09	44.73

### 2.2 流动相的选择

以甲醇-0.7% 三氟醋酸溶液为流动相时,17 个组分不能达到完全分离。而以乙腈-0.7% 三氟醋酸溶液为流动相分离效果较好,各峰之间基本达到基线分离,但大部分色谱峰拖尾严重,在其水相中加入少量七氟丁酸后,进一步抑制了各组分的解离,峰形得到了较好的改善。对水相中七氟丁酸的加入量(浓度分别加至 3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 mmol/L)进行了考察,结果表明:七氟丁酸的浓度对峰形有较大的影响,其中以浓度为 5.0 mmol/L 时效果最佳。此时,各色谱峰对称性好,峰形尖锐。因此,选择水相中七氟丁酸浓度为 5.0 mmol/L 较为适宜。

为了在较短时间内分离 17 种氨基酸成分,并提高其灵敏度,在上述实验基础上,研究了不同梯度洗脱条件对分离效果的影响。最终在“1.3”节所述线性梯度洗脱程序下,在 25 min 内同时检出了样品中的 17 种氨基酸成分。

### 2.3 检测器参数的选择

蒸发光散射检测器的漂移管温度和气体流量是影响检测结果的重要参数。漂移管温度低于某一温度时,因流动相得不到充分的挥发,基线水平较高,而温度过高时,可能会带来较大的噪声,随着气体流量的增大,响应值也随之减小。基于上述原因考虑,本研究中分别考察了漂移管温度(110,115,120 °C)和氮气流量(2.2,2.5,2.8 L/min)对检测结果的影响,结果表明,在漂移管温度为 115 °C、氮气流量为 2.5 L/min 时,基线平稳、噪声较小、有适宜的响应

值。因此,最终选择了此参数进行测定。

## 2.4 系统适用性实验

分别精密吸取标准品混合溶液和供试品溶液各 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪,记录色谱图(见图 1 和图 2),计算各组分的理论塔板数和分离度,其最小值分别为 2 389( Tyr )和 1. 29( Asp 与 Ala )。

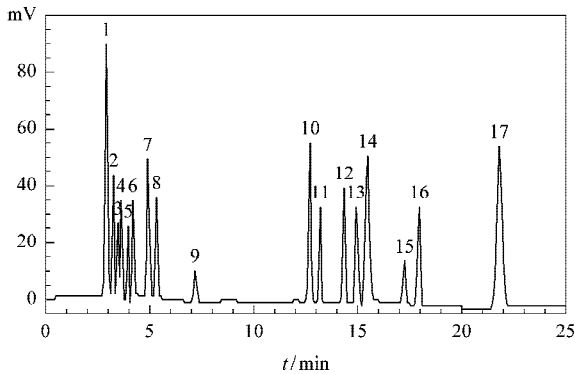


图 1 17 种标准品混合溶液的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.1 Chromatogram of mixed standards of 17 amino acids by HPLC-ELSD

1. Gly ; 2. Ser ; 3. Asp ; 4. Ala ; 5. Thr ; 6. Glu ; 7. Cys ; 8. Lys ; 9. His ; 10. Arg ; 11. Pro ; 12. Val ; 13. Met ; 14. Tyr ; 15. Ile ; 16. Leu ; 17. Phe.

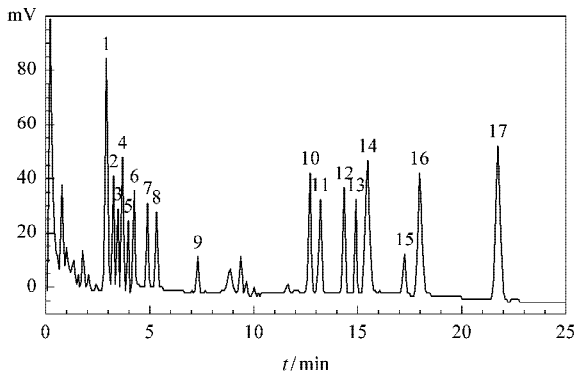


图 2 阿胶药材供试品溶液的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig.2 Chromatogram of donkey-hide glue solution by HPLC-ELSD

Peak identifications are the same as in Fig. 1.

## 2.5 线性关系和最低检测限考察

分别取 17 种氨基酸质量浓度均约为 2. 327 , 1. 745 , 1. 164 , 0. 582 和 0. 073 g/L 的标准品混合溶液,在上述色谱条件下分析,以各种氨基酸峰面积的对数值  $Y$  为纵坐标,氨基酸质量浓度(g/L)的对数值  $X$  为横坐标进行线性回归,得到的线性回归方程见表 2。当信噪比为 3 时,测得各氨基酸组分的最低检测限介于 18. 2 mg/L 与 54. 6 mg/L 之间,其中组氨酸的最低检测限为 18. 2 mg/L。

## 2.6 方法的精密度和重复性考察

取 1. 164 g/L 标准混合液 10  $\mu$ L,连续进样 5 次,各组分色谱峰的保留时间波动小于 0. 2 min,峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0. 17% ~ 1. 63%。

表 2 17 种氨基酸的线性方程

Table 2 Regression equations of 17 amino acids

Amino acid	Regression equation	$r$
Gly	$Y = 1. 3933X - 3. 9519$	0. 9998
Ser	$Y = 1. 6321X + 4. 7050$	0. 9989
Asp	$Y = 1. 6230X + 4. 0937$	0. 9993
Ala	$Y = 1. 5526X + 5. 6248$	0. 9996
Thr	$Y = 1. 4381X + 6. 3353$	0. 9998
Glu	$Y = 1. 8665X + 3. 8786$	0. 9999
Cys	$Y = 1. 7843X + 4. 8975$	0. 9994
Lys	$Y = 2. 0621X - 3. 5869$	0. 9992
His	$Y = 1. 8881X + 5. 2475$	0. 9997
Arg	$Y = 2. 8094X + 4. 5782$	0. 9992
Pro	$Y = 1. 7532X + 5. 0588$	0. 9998
Val	$Y = 1. 3022X + 5. 2305$	0. 9993
Met	$Y = 1. 3892X - 4. 5983$	0. 9987
Tyr	$Y = 1. 9994X + 5. 0024$	0. 9998
Ile	$Y = 2. 1170X + 4. 8535$	0. 9994
Leu	$Y = 1. 4092X + 3. 5393$	0. 9990
Phe	$Y = 1. 6063X + 4. 5387$	0. 9994

$Y$ : logarithm of peak area ;  $X$ : logarithm of mass concentration.

取同一批样品按供试品溶液制备方法平行制备 5 份,分别进样 10  $\mu$ L,同时取不同浓度的标准品混合溶液各 10  $\mu$ L 进样测定,按外标两点法分别取对数值,计算其含量的 RSD,结果为 0. 77% ~ 2. 58%。

## 2.7 供试品溶液的稳定性及加样回收率考察

取同一供试品溶液,分别在保存 0, 4, 8, 12, 24 h 后以新配制的标准品混合溶液为对照,按外标两点法分别取对数值计算,其 RSD 为 0. 46% ~ 2. 43%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

精密称取阿胶样品粗粉约 25 mg 置于锥形瓶中,加入一定量的氨基酸标准品混合溶液后,按供试品溶液制备方法制备后测定,结果见表 3。

表 3 17 种氨基酸的加样回收率( $n = 3$ )

Table 3 Recoveries of 17 amino acids added ( $n = 3$ )

Amino acid	Added/mg	Found/mg	Recovery/%	RSD/%
Gly	1. 828	1. 768	96. 7	0. 58
Ser	0. 624	0. 633	101. 5	1. 93
Asp	0. 948	0. 993	104. 8	0. 78
Ala	1. 579	1. 544	97. 8	0. 83
Thr	0. 429	0. 434	101. 1	2. 57
Glu	1. 627	1. 642	100. 9	1. 35
Cys	0. 493	0. 467	94. 8	1. 80
Lys	0. 751	0. 730	97. 2	1. 16
His	0. 175	0. 164	93. 5	2. 88
Arg	1. 477	1. 468	99. 4	1. 10
Pro	0. 628	0. 646	102. 9	1. 87
Val	0. 614	0. 604	98. 3	2. 05
Met	0. 445	0. 451	101. 4	1. 21
Tyr	0. 763	0. 773	101. 3	1. 60
Ile	0. 356	0. 355	99. 8	1. 24
Leu	0. 698	0. 729	104. 4	1. 72
Phe	0. 688	0. 711	103. 3	1. 55

## 2.8 实际样品分析

在上述色谱条件下,称取 3 批阿胶药材粗粉各约 50 mg,精密称定,按供试品溶液制备方法制备后测定,结果见表 4。

表 4 样品测定结果( $n=3$ )

Table 4 Results of sample determination ( $n=3$ )

Amino acid	$w(\text{Amino acid})/\%$		
	batch No. 20050401	batch No. 20050402	batch No. 20050403
Gly	6.99	7.11	6.53
Ser	2.47	2.63	2.33
Asp	3.92	3.88	3.75
Ala	6.11	6.23	6.02
Thr	1.71	1.69	1.63
Glu	6.51	6.63	6.52
Cys	1.83	1.97	1.86
Lys	2.89	2.79	2.72
His	0.64	0.76	0.51
Arg	5.83	5.99	5.61
Pro	2.51	2.69	2.38
Val	2.41	2.58	2.31
Met	1.77	1.92	1.66
Tyr	3.04	2.97	2.65
Ile	1.38	1.49	1.24
Leu	2.91	3.17	2.78
Phe	2.73	2.93	2.27
$w(\text{Total amino acids})/\%$	55.65	57.43	52.77

## 3 结论

本研究对阿胶中氨基酸的组成及含量进行了分析,共分离测定了 17 种氨基酸且总含量大于 50%。研究中采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定氨基酸,样品无需衍生化可直接进样分析,不需要繁琐的前处理,避免了衍生化法测定氨基酸时对衍生化条件(衍生化试剂、反应条件等)的筛选,减小

了测定误差,操作简便,结果可靠。该分析方法可用于阿胶药材的质量控制,亦为其他药物中氨基酸成分的分析提供了参考。

目前,除高效液相色谱-蒸发光散射检测法外,还有高效液相色谱-大气压微波等离子体离子化质谱<sup>[5]</sup>、离子对反相液相色谱-同位素稀释串联质谱<sup>[6]</sup>、毛细管电泳-电喷雾离子化质谱<sup>[7-9]</sup>、高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法<sup>[10]</sup>等也可用于分析未衍生氨基酸。进一步对不同方法进行比较研究,揭示各自的特点,势必将对未衍生氨基酸的分析产生积极意义。

## 参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part 1. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部. 北京:化学工业出版社), 2005:130
- [2] Guo Chenghao, Jin Yi, Zhang Hui, Zhang Jiping, Xue Weiling, Xiang Fenggang. China Journal of Chinese Materia Medica (郭成浩, 金毅, 张辉, 张吉平, 薛炜玲, 项锋钢. 中国中药杂志), 1999, 24(1):54
- [3] Huo Guanghua. Amino Acids & Biotic Resources (霍光华. 氨基酸和生物资源), 1996, 18(4):22
- [4] Petritis K, Elfakir C, Dreux M. J Chromatogr A, 2002, 961(1):9
- [5] Kwon J Y, Moini M. J Am Soc Mass Spectrum, 2001, 12:117
- [6] Qu J, Wang Y M, Luo G A, Wu Z P, Yang C D. Anal Chem, 2002, 74:2034
- [7] He T, Quinn D, Fu E, Wang Y K. J Chromatogr B, 1999, 727:43
- [8] Soga T, Heiger D N. Anal Chem, 2000, 72:1236
- [9] Schultz C L, Moini M. Anal Chem, 2003, 75:1508
- [10] Yu Hong, Mou Shifen. Chinese Journal of Analytical Chemistry (于泓, 牟世芬. 分析化学), 2005, 33(3):398