

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.01.019

柱前衍生高效液相色谱法测定注射用骨肽中 15 种氨基酸含量

张雪艳,郭 雷,周长明,张建敏[△]

(北京市药品检验所·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室,北京 102206)

摘要:目的 建立测定注射用骨肽中 15 种氨基酸含量的柱前衍生高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Zorbax Eclipse AAA 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),衍生剂为邻苯二甲醛(自动衍生化进样程序),流动相 A 为 40 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 7.8),流动相 B 为乙腈-甲醇-水(45:45:10, V/V/V),梯度洗脱,流速为 2.0 mL/min,检测波长为 338 nm,柱温为 40 ℃。结果 门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸的质量浓度均在 0.01~1.59 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9976$);检测限为 0.008 3 nmol/μL,定量限为 0.025 nmol/μL,稳定性和重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%($n=6$);平均加样回收率为 92.63%~108.28%,RSD 为 0.87%~2.66%($n=9$);3 批样品中氨基酸总含量分别为 1.83%,1.75%,1.73%。结论 该方法操作简便,准确度高,稳定性和重复性均较好,可用于测定注射用骨肽中 15 种氨基酸的含量。

关键词:注射用骨肽;柱前衍生法;高效液相色谱法;氨基酸;含量

中图分类号:R927.1;R977.4

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)01-0074-03

Content Determination of 15 Amino Acids in Ossotide for Injection by Precolumn Derivatization HPLC

ZHANG Xueyan, GUO Lei, ZHOU Changming, ZHANG Jianmin

(1. Beijing Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish a precolumn derivation high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of 15 amino acids in Ossotide for Injection. **Methods** The chromatographic column was Zorbax Eclipse AAA column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the derivatization agent was *O*-phthalaldehyde (OPA) with automatic injection procedure, the mobile phase A was 40 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (pH 7.8), the mobile phase B was acetonitrile-methanol-water (45:45:10, V/V/V) with gradient elution, the flow rate was 2.0 mL/min, the detection wavelength was 338 nm, and the column temperature was 40 ℃. **Results** The mass concentrations of aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, arginine, alanine, tyrosine, valine, methionine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.01-1.59 mg/mL ($r \geq 0.9976$). The limit of detection (LOD) was 0.008 3 nmol/μL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.025 nmol/μL. The RSDs of stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$). The average recoveries of 15 amino acids were in the range of 92.63%-108.28% with RSDs of 0.87%-2.66% ($n=9$). The total contents of amino acids in three batches of samples were 1.83%, 1.75% and 1.73%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, stable and reproducible, which can be used for the content determination of 15 amino acids in Ossotide for Injection.

Key words: Ossotide for Injection; precolumn derivation; HPLC; amino acid; content

注射用骨肽是以新鲜或冷冻猪四肢提取的骨肽溶液制成的无菌冻干品,含有多种多肽类骨代谢活性因子、有机钙、磷、无机盐、氨基酸、微量元素等,是一种具有生物活性的多组分生化药,可促进骨折愈合,修复损伤,减轻疼痛,也可改善增生性骨关节疾病及风湿、类风湿关节炎等症状^[1-4]。2020年版《中国药典》未收载骨肽类制剂。国家药品标准 YBH16462005 中,采用双缩脲法测定注射用骨肽中多肽的含量,通过碘基水杨酸与蛋白质产生沉淀,规定了蛋白质的限度,但未规定氨基酸的含量^[5-6]。目前,氨基酸的检测方法很多,如氨基酸自动分析仪、气质联用仪和柱前衍生高效液相色谱(HPLC)法^[7]。柱前衍生化法属间接分析法,样品中氨基酸在特定

条件下与衍生试剂发生化学反应,生成有发色或发光的衍生物后,再进行色谱分离和测定,广泛用于动物药中氨基酸类成分的测定^[8-12]。常用衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、9-苄基氯甲酸酯(FMOC)、2,4-二-硝基氟苯(DNFB)、异硫氰酸苯酯(PITC)等,本研究中建立了测定注射用骨肽中门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸 15 种氨基酸含量的邻苯二甲醛柱前衍生 HPLC 法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

第一作者:张雪艳,女,硕士,药师,研究方向为生化药物和生物制品检验,(电子信箱)BJzhangxueyan@126.com。

[△]通信作者:张建敏,男,硕士,主管药师,研究方向为生化药物和生物制品检验,(电子信箱)meiadeng@126.com。

司);Seven Easy型酸度计,XS205型电子天平(精度为十万分之一),均购于瑞士Mettler Toledo公司。

1.2 试药

标准氨基酸对照溶液(美国Waters公司,批号为VC290480,规格为2.5 μmol/mL);精氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为140624-201506,规格为每支100 mg,纯度为99.9%);硼酸钠,二水合磷酸二氢钠,甘露醇,均购于国药集团化学试剂有限公司;邻苯二甲醛(Sigma-Aldrich公司);乙腈、甲醇(色谱纯,默克股份两合公司);水为超纯水;注射用骨肽(批号分别为1901161E1,1904211E1,171109E2,规格为每支含25 mg多肽)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse AAA柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A为40 mmol/L磷酸二氢钠溶液(pH=7.8),B为乙腈-甲醇-水(45:45:10, V/V/V)溶液,梯度洗脱程序见表1;流速:2.0 mL/min;检测波长:338 nm;柱温:40 ℃。

表1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab.1 Gradient elution program of the mobile phase (%)

时间	流动相B	时间	流动相B
0~1.9 min	0	18.6~22.3 min	100
1.9~18.1 min	57	22.3~23.2 min	0
18.1~18.6 min	100		

自动衍生化进样程序:吸取0.4 mol/L硼酸盐缓冲液2.5 μL、待测溶液0.5 μL,在100 μL自动进样器中混合2次,等待0.5 min;吸取邻苯二甲醛衍生溶液0.5 μL,在100 μL自动进样器中混合6次;吸取水32 μL,在100 μL自动进样器中混合2次,进样。

2.2 溶液制备

取邻苯二甲醛80 mg,精密称定,加入0.4 mol/L硼酸盐缓冲液(pH 10.2)7 mL、乙腈1 mL、巯基丙酸125 μL,混匀,即得邻苯二甲醛衍生溶液,于4 ℃保存。取硼

钠15.25 g,加水100 mL溶解,用氢氧化钠溶液调pH至10.2,即得硼酸盐缓冲液。取标准氨基酸对照溶液(质量浓度为2.5 μmol/mL)作为对照品贮备液,精密量取4 mL,置10 mL容量瓶中,加水稀释至刻度,混匀,即得对照品溶液。取样品1支,精密加水5 mL,溶解,摇匀,即得供试品溶液。取甘露醇(注射用骨肽中辅料)100 mg,精密称定,加5 mL水溶解,即得空白溶剂。

2.3 方法学考察

专属性试验:取空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果空白溶剂未出现干扰主峰测定的色谱峰,供试品溶液与对照品溶液色谱中,氨基酸峰保留时间一致,各氨基酸间分离度均大于1.5。色谱图见图1。

线性关系考察、检测限和定量限确定:取对照品贮备液40, 80, 200, 400, 600 μL,分别加水稀释至1 mL,制成氨基酸质量浓度分别为0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.25 μmol/mL的系列溶液,取上述溶液和对照品贮备液各适量,注入高效液相色谱仪,记录色谱图。以质量浓度(X, μmol/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,分别计算14种氨基酸(除精氨酸)的回归方程。取精氨酸49.80 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加水溶解并定容,作为精氨酸对照品贮备液,精密量取0.2, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4, 8.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加水稀释并定容,摇匀,即得精氨酸线性溶液。结果见表1。以信噪比(S/N)为3:1时的质量浓度为检测限, S/N为10:1时的质量浓度为定量限。结果检测限和定量限分别为0.008 3 nmol/μL和0.025 0 nmol/μL。

重复性试验:取样品1支,精密加入5 mL水,按2.1项下色谱条件进样测定。结果峰面积的RSD为0.25%~1.64%,表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时进样测定,记录色谱图,按外标法计算15种氨基酸的含量。结果的RSD为0.37%~1.64%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

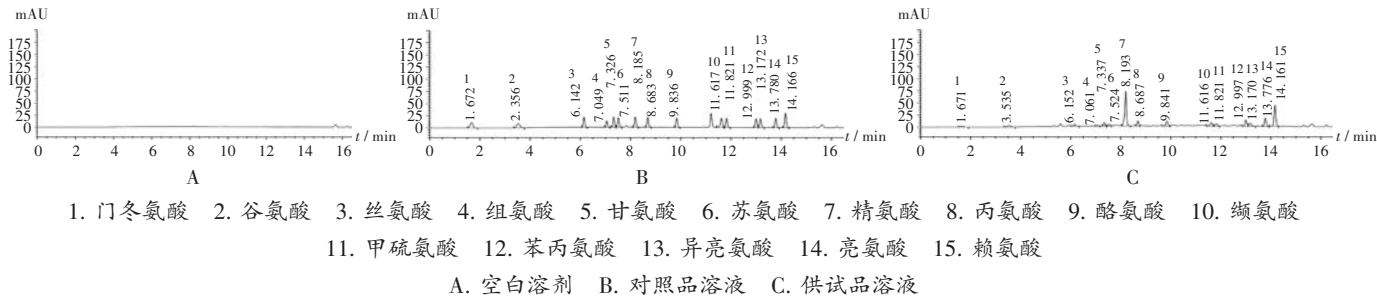


图1 高效液相色谱图

1. Aspartic Acid 2. Glutamate 3. Serine 4. Histidine 5. Glycine 6. Threonine 7. Arginine 8. Alanine 9. Tyrosine 10. Valine
11. Methionine 12. Phenylalanine 13. Isoleucine 14. Leucine 15. Lysine
A. Blank solvent B. Reference solution C. Test solution

Fig.1 HPLC chromatograms

加样回收试验:取样品(批号为1901161E1)3支,精密加入5 mL水溶解,摇匀,作为本底溶液。精密量取本底溶液0.5 mL,分别加入氨基酸对照品溶液0.25, 0.50, 0.75 mL,水0.75, 0.50, 0.25 mL,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录色谱图。按外标法计算样品中15种氨基酸的回收率,结果见表2。

表2 15种氨基酸线性关系考察与加样回收试验结果($n=9$)
Tab.2 Results of the linear relation test and the recovery test of 15 amino acids($n=9$)

氨基酸	线性方程	线性范围(mg/mL)	r	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
门冬氨酸	$Y=76.305X+4.9105$	0.01331~0.3328	0.9991	103.37	1.76
谷氨酸	$Y=82.072X-1.4828$	0.01471~0.3678	0.9991	102.80	1.03
丝氨酸	$Y=85.571X+3.2585$	0.01051~0.2627	0.9985	104.87	1.31
组氨酸	$Y=52.17X+1.7898$	0.01551~0.3878	0.9987	100.81	1.29
甘氨酸	$Y=89.263X+3.1475$	0.00751~0.1877	0.9985	102.68	2.11
苏氨酸	$Y=83.906X+3.1841$	0.01191~0.2978	0.9989	92.63	2.27
精氨酸	$Y=93.843X+4.6524$	0.03980~1.5920	0.9985	105.18	2.12
丙氨酸	$Y=91.165X+3.1495$	0.00891~0.2228	0.9984	108.28	2.03
酪氨酸	$Y=81.255X+3.3824$	0.01812~0.4530	0.9986	101.51	1.10
缬氨酸	$Y=100.7X+3.2415$	0.01172~0.2929	0.9976	106.01	2.66
甲硫氨酸	$Y=87.297X+2.4187$	0.01492~0.3730	0.9990	99.54	0.87
苯丙氨酸	$Y=81.31X+4.1029$	0.01652~0.4130	0.9997	99.92	1.83
异亮氨酸	$Y=85.376X+3.5089$	0.01312~0.3280	0.9988	103.67	2.03
亮氨酸	$Y=86.927X+3.6383$	0.01312~0.3280	0.9986	98.51	1.50
赖氨酸	$Y=150.64X+5.5039$	0.02312~0.4624	0.9995	106.64	2.11

2.4 样品含量测定

取3批样品,按2.1项下色谱条件测定样品中15种氨基酸的含量。结果见表3。

表3 3批注射用骨肽中15种氨基酸的含量测定结果(%)
Tab.3 Results of content determination of 15 amino acids in three batches of Ossotide for Injection(%)

氨基酸	1901161E1	1904211E1	171109E2	RSD(%)
门冬氨酸	0.0260	0.0269	0.0255	0.82
谷氨酸	0.0579	0.0606	0.0557	0.95
丝氨酸	0.0241	0.0236	0.0228	0.92
组氨酸	0.0286	0.0330	0.0265	1.64
甘氨酸	0.0288	0.0270	0.0269	0.94
苏氨酸	0.0304	0.0292	0.0294	1.07
精氨酸	0.7577	0.6823	0.7300	0.25
丙氨酸	0.0532	0.0581	0.0514	1.38
酪氨酸	0.1381	0.1376	0.1341	1.37
缬氨酸	0.0511	0.0531	0.0492	1.13
甲硫氨酸	0.0531	0.0535	0.0513	1.20
苯丙氨酸	0.1347	0.1317	0.1285	1.12
异亮氨酸	0.0666	0.0670	0.0646	1.08
亮氨酸	0.1273	0.1277	0.1229	1.12
赖氨酸	0.2474	0.2414	0.2147	1.02
氨基酸总含量	1.83	1.75	1.73	

3 讨论

注射用骨肽是结构复杂、多组分的生化药,其回收试验与组分单一、纯度高的化学药相比,要求规范操作,精确取样,以减少误差。注射用骨肽中15种氨基酸的加样回收试验按1:0.5, 1:1.0, 1:1.5设计,结果回收良好。另外,样品中精氨酸质量浓度为0.72 mg/mL,远高于其他氨基酸的质量浓度,单独制备精氨酸的线性溶液,考察精氨酸质量浓度与峰面积的线性关系,结果较好。

注射用骨肽是从动物组织中提取的药物,成分的含量会影响药效及不良反应,质量可控性不够一直制约着骨肽类药物的应用和发展。注射用骨肽质量标准中并未规定氨基酸检查项,若控制每种氨基酸的含量,会增加企业生产成本,但通过测定注射用骨肽中氨基酸总含量,可为生产企业控制注射用骨肽的质量、监控生产工艺提供参考,也可供类似品种的质量控制参考。

本研究中建立的方法操作简便,灵敏度高,结果准确,重复性和稳定性均较好,可实现在线衍生,减少人员误差,可用于测定注射用骨肽中15种氨基酸的含量。

参考文献

- [1] 赵海鹰. 复方骨肽注射液用于开放性胫骨骨折外固定架术后临床评价[J]. 中国药业, 2016, 25(16): 37-39.
- [2] 顾丽娜. 注射用复方骨肽促进四肢骨折愈合的临床观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(45): 10.
- [3] 任玉红, 李小兵, 李安琪. 注射用骨肽治疗早期四肢骨折的疗效观察[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(1): 64-65.
- [4] 姜溪, 陈芙蓉, 任雷鸣, 等. 注射用复方骨肽的药效学及其作用机制研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(6): 961-966.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 435-437.
- [6] YBH16462005, 注射用骨肽[S].
- [7] 田洪斌, 赵可意, 孙佳玲. 氨基酸分析法测定复方骨肽注射液中多肽含量[J]. 中国药事, 2011, 25(8): 816-820.
- [8] 李婷, 刘力, 徐德生. 氨基酸柱前衍生法在动物药质量控制中的应用[J]. 中国药业, 2014, 23(2): 16-18.
- [9] 张亿, 朱蓉, 郑萍, 等. 邻苯二甲酰柱前衍生化 HPLC 法测定复方制剂中盐酸赖氨酸的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(15): 2131-2133.
- [10] 邵天舒, 郭雷, 周长明. 邻苯二甲酰柱前衍生化-HPLC 测定复方氨基酸注射液中蛋氨酸亚砷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(4): 497-500.
- [11] 李灿明, 柏建国, 刘桂果, 等. 邻苯二甲酰柱前在线衍生反相高效液相色谱法测定功能饮料中赖氨酸的含量[J]. 化学分析计量, 2017, 26(5): 85-88.
- [12] 杨清山, 程远欣, 刘登帅, 等. HPLC 柱前衍生法测定棉籽蛋白中17种氨基酸含量[J]. 中国油脂, 2020, 45(12): 17-21.

(收稿日期: 2021-02-03; 修回日期: 2021-06-21)