

氨基酸分析仪在药品检测中的应用研究

娄晨*

(温州医科大学科研实验中心, 温州 325035)

摘要: 氨基酸是众多药品中的重要活性成分, 快速准确地检测药品中的氨基酸含量, 对确保药品药用价值有着重要的意义。相较于传统氨基酸检测方法, 使用氨基酸分析仪检测药品中的氨基酸含量, 具备实验操作简单, 检测速度快, 检测结果准确, 重复性好等特点。目前氨基酸分析仪在药品检测中的应用研究已经取得了一定的进展, 随着其技术的发展, 氨基酸分析仪必将成为药品检测中的重要工具。

关键词: 氨基酸分析仪; 药品; 检测方法; 应用研究

0 引言

恩格斯曾说过:“蛋白质是生命的物质基础, 生命是蛋白质存在的一种形式。”蛋白质在人体内并不能够直接被吸收利用, 而是通过分解成为氨基酸有机小分子后才能被人体吸收。氨基酸是构建生物机体、维持生命活动的生物活性大分子之一。目前为止, 已发现 300 多种天然氨基酸, 其中为人体所需的氨基酸有 22 种^[1]。氨基酸对人体机能的正常运行起了至关重要的作用。氨基酸在医药领域的应用非常广泛, 在许多合成多肽类药品、氨基酸制剂、中药材中氨基酸都是重要组成成分, 准确检测药品中的氨基酸含量是保证药品质量安全的重要一环。氨基酸分析仪是一种专门用于检测氨基酸的大型仪器, 本文将从传统氨基酸检测方法、氨基酸分析仪的检测情况、氨基酸分析仪在药品检测中的应用实例等方面详述氨基酸分析仪在药品检测中的应用情况。

1 传统氨基酸检测方法概述

药品安全与人民生活密切相关, 准确测定药品中的氨基酸含量, 保证药品质量, 是国家药品质量检测的重要组成部分。传统的氨基酸检测方法有分光光度法、毛细管电泳法、液相色谱法等。

1.1 分光光度法检测氨基酸含量

氨基酸与衍生物茚三酮加热发生化学反应, 形成深蓝紫色复合物, 在 570 nm 波长处有吸收峰, 羟脯氨酸与衍生物茚三酮反应不释放 NH_3 , 直接生成黄色化合物, 在 440 nm 波长处有吸收峰^[2]。通过测定不同浓度氨基酸标准品的吸光度值制作标

准曲线, 根据吸光度值从而获得被测氨基酸的含量。分光光度法检测氨基酸含量适用范围广, 测试成本低, 操作方便简单, 但测试结果容易受实验操作影响, 操作不规范会导致实验误差较大。

1.2 毛细管电泳法检测氨基酸含量

毛细管电泳法是一种现代微柱分离与电泳技术相结合的方法^[3], 通过毛细管电泳将多种氨基酸进行分离, 之后与光学检测或电化学检测技术结合运用, 检测氨基酸含量。根据分离原理的不同, 毛细管电泳法可以划分为毛细管凝胶电泳、毛细管等电点电泳、毛细管区带电泳、毛细管等速电泳和胶束电动毛细管电泳等^[4]。毛细管电泳法进样量小, 溶剂消耗量少, 分析速度快效率高, 经常用于氨基酸的分离检测, 毛细管电泳法的测试结果同样易受实验操作影响, 结果重现性较差。

1.3 液相色谱法检测氨基酸含量

液相色谱以液体为流动相, 采用高压输液系统, 将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱, 在柱内各种不同的氨基酸被分离, 依次进入检测器进行分析。由于大多数氨基酸没有紫外吸收或者荧光反应, 通过液相色谱检测氨基酸必须对氨基酸样品进行衍生化处理, 经过化学反应转变成具有紫外吸收或者荧光反应的物质^[5]。衍生化处理根据反应的先后顺序可以分成柱前衍生化和柱后衍生化。柱前衍生化是在样品进入色谱柱前, 完成氨基酸的衍生反应, 常用于柱前衍生反应的衍生剂有邻苯二甲醛、丹磺酰氯、茚二甲醛等。柱后衍生化是氨基酸样品先经过色谱柱进行分离, 分离后的氨基酸再进行衍生化反应, 常用的柱后衍生剂有茚三酮和氟胺等。液相色谱紫外检测器(HPLC-UV)

* 通信作者: 娄晨, 硕士, 实验员, 主要研究方向为大型仪器共享平台分析学相关仪器的应用与管理。E-mail: 1439948160@qq.com

和荧光检测器(HPLC-FLD)均可用于氨基酸的检测。液相色谱法检测氨基酸所需的样品量少,灵敏度高,但实验操作过程繁琐,需人工完成柱前衍生化或者柱后衍生化反应,影响因素较多。

2 氨基酸分析仪对药品中氨基酸的检测研究

氨基酸分析仪能够快速准确完成药品中的氨基酸检测。以日立 LA8080 全自动氨基酸分析仪为例,简述氨基酸分析仪在检测药品中氨基酸含量的过程中的要点。

2.1 药品中氨基酸分析的前处理方法

使用氨基酸分析仪检测药品中的氨基酸前需要对药品样品进行前处理,处理方法可以分为两种,一种是游离氨基酸检测前处理,包含氨基酸及其化合物,如氨基酸口服液等。另一种是检测蛋白质水解获得的氨基酸的前处理,如一些合成多肽类片剂药品、中药材等。

游离氨基酸检测前处理操作步骤相对简单。氨基酸口服液等液体制剂药品可以使用 1%~5% 的三氯乙酸溶液将原料浓度稀释,氨基酸含量较低的药品稀释至十分之一,氨基酸含量较高的药品需要稀释至二百分之一,之后以 10000 r/min 对其离心处理 15 min,取澄清液体作为样品。部分无沉淀的含水药品可以直接用 0.02 mol/L 的稀盐酸稀释作为样品。

蛋白质水解获得的氨基酸的前处理操作步骤相对复杂。最常使用的是酸水解法,酸水解法适用于大多数氨基酸。待测药品称重后放入玻璃水解管中,加入 6 mol/L 盐酸,在减压或真空条件下密封水解管,使用水解器或烘箱在 110℃ 条件下水解 24 h,打开玻璃水解管,浓缩干燥,用 0.02 mol/L 的稀盐酸复溶作为样品。含磷氨基酸或色氨酸可以使用碱水解法,称取一定量的药品样品放于四氟乙烯衬管中,加 0.1 mol/L 的氢氧化钠或者氢氧化锂,置于液氮中冷冻,将四氟乙烯衬管放进水解玻璃管中,在减压或真空条件下密封水解管,使用水解器或烘箱在 110℃ 条件下水解 20 h,取出水解管,冷却开管,加入盐酸溶液中和,浓缩干燥,用 0.02 mol/L 的稀盐酸复溶作为样品^[6]。

2.2 日立 LA8080 全自动氨基酸分析仪检测氨基酸情况

日立 LA8080 全自动氨基酸分析仪采用衍生化间接分析方法,分离色谱柱填充阳离子交换树脂,作为固定相,酸性缓冲液为流动相,氨基酸样品先在分离柱经阳离子交换树脂分离,使用不同 pH 值及离子强度的缓冲液,按照洗脱程序依次将氨基酸洗脱,被洗脱下来的氨基酸进入反应柱,进行茚三酮衍生化反应,最后被检测器检测,外标法定量^[7]。LA8080 全自动氨基酸分析仪 open LAB 控制软件自带分析方法,符合国标 GB 5009.3《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》^[8]和国家药典委员会《氨基酸分析指导原则草案公示稿(第二次)》的检测要求,简化了方法开发的步骤,节约检测时间。

选用 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation 生产的混合氨基酸标准溶液 Type H 型作为样品(浓度 2 nmol/20 μL),经过 LA8080 全自动氨基酸分析仪的离子交换柱(4.6 mm I.D.×60 mm L#2622)分离,在 135℃ 加热的反应条件下与茚三酮衍生化反应,生成蓝紫色复合物,570 nm 波长可以检测(通道 VWD1E,VIS 1),其中脯氨酸与茚三酮衍生化反应生成浅黄色化合物,检测波长为 440 nm(通道 VWD1F,VIS 2)。混合氨基酸标准溶液进样结果如表 1 所示。

表 1 混合氨基酸标准溶液检测结果

Signal: VWD1E,VIS 1					
RT (min)	Name	Peak Height	Area	MOLWeight (ng)	Peak Resolution JP
5.367	Asp	76.977	1028.986	266.200	
5.987	Thr	79.258	1079.597	238.200	1.776
6.613	Ser	79.963	1096.188	210.200	1.782
7.373	Glu	72.850	1112.579	294.200	2.037
10.387	Gly	54.086	1044.061	150.140	5.187
11.400	Ala	43.291	1052.204	178.180	1.789
12.787	Cys	116.364	1166.191	480.600	3.116
13.393	Val	81.762	1076.523	234.200	2.027
14.613	Met	58.816	1076.237	298.400	2.985
16.927	Ile	39.882	1035.602	262.400	3.963
18.027	Leu	42.441	971.390	262.400	1.695
18.647	Tyr	60.367	1022.460	362.400	1.172
19.540	Phe	51.532	990.483	330.400	1.868
21.673	Lys	94.514	1146.853	292.400	5.178
23.040	NH ₃	38.192	771.730	34.060	3.207
23.960	His	64.650	1070.455	310.400	1.915
27.893	Arg	40.396	1007.922	348.400	7.276
Signal: VWD1F,VIS 2					
RT (min)	Name	Peak Height	Area	MOLWeight (ng)	Peak Resolution JP
7.953	Pro	13.210	182.902	230.200	

分离度是判断混合氨基酸在分离柱中分离情况的关键指标,评价不同氨基酸之间的分离程度。分离度越大,说明相邻两种氨基酸分离效果越好,通常分离度大于 1.5 时,认为两种氨基酸完全分离。由表 1 可知,混合氨基酸中各种氨基酸的分离度基本均大于 1.5,说明分离效果较好,全自动氨基酸分析仪能较好地完成氨基酸的检测。全自动氨基酸分析仪检测氨基酸操作简单,样品无需单独进行衍生化处理,可以对多种氨基酸直接进行分析,检测效果良好。

3 氨基酸分析仪在药品检测中的应用实例

随着人民生活水平的提高,药品安全问题日益受到重视,药品质量安全是不可逾越的红线。有些非法厂商为了追求利益,降低成本,忽视药品质量,这种行为不仅降低药品药效,甚至还会

威胁人体健康。药品质量检测是国家相关部门的重点关注事项,屡禁不止的药品安全事件引发了社会关于药品质量检测方法的思考。氨基酸已成为衡量药品药用价值的重要指标之一,国内外众多学者从多元视角关注药品中氨基酸检测的相关研究,随着氨基酸检测方法的不断发展,其应用也越来越广泛,其中氨基酸分析仪对药品中氨基酸含量的检测取得了一定的研究进展。

邵天舒等^[9]建立了一种日立 L8900 型氨基酸分析仪快速检测复方氨基酸注射液中游离氨含量的检测方法。复方氨基酸注射液是一种平衡型氨基酸补充剂,含有 18 种人体所需氨基酸,在患者无法通过饮食或口服等方式摄入氨基酸时,通过静脉注射复方氨基酸注射液能够快速补充氨基酸。但复方氨基酸注射液在保存中会产生游离氨(NH₃),在人体内可能转化为亚硝酸盐,危害身体健康。该检测方法能够同时有效地检测复方氨基酸注射液中的游离氨及十八种氨基酸的含量,保证临床用复方氨基酸注射液的药品质量。

苏芳等^[10]使用氨基酸分析仪对阿波莫斯颗粒剂中的鸟氨酸与门冬氨酸进行检测。鸟氨酸与门冬氨酸是阿波莫斯颗粒剂的主要成分,对肝炎及肝性疾病有良好的治疗效果。使用氨基酸分析仪对其的检测灵敏度高,可以同时控制两种氨基酸的总量和含量比。

何虹等^[11]开发了一种氨基酸分析仪检测口服五维赖氨酸葡萄糖中盐酸赖氨酸含量的方法。相较于其他检测方法,氨基酸分析仪对盐酸赖氨酸的检测能够有效地减少该药品中其他组分如维生素 B、葡萄糖、烟酰胺等的干扰,为药品质量提供保证。

段秀俊等^[12]利用氨基酸分析仪对不同批次雀脑中的氨基酸含量进行检测。雀脑为一味具备补益肾阳作用的传统中药,其有效成分的含量对药效有非常大的影响。研究表明雀龄、采收季节、地区等因素对雀脑药材中的氨基酸含量有明显影响,对雀脑中药材的采收提供建议和帮助。

Qureshi 等^[13]利用氨基酸分析仪成功地对药蜀葵、洋甘菊及蒲公英 3 种中药材中的氨基酸的含量进行检测。研究显示天冬酰胺和脯氨酸是洋甘菊和蒲公英中的主要氨基酸,而药蜀葵中天冬酰胺和精氨酸含量最高。氨基酸分析仪可以应用于天然产物药物中氨基酸的定性和定量分析。

肖云娜等^[14]通过氨基酸分析仪对复方 α -酮酸片中的游离氨基酸含量进行检测。复方 α -酮酸片用于改善糖尿病患者或肾病患者的肾功能,含有酪氨酸、苏氨酸、醋酸赖氨酸、色氨酸、组氨酸共 5 种活性成分。使用氨基酸分析仪对复方 α -酮酸片中氨基酸的检测比传统液相检测方法操作更加便捷,并且有效地去除了因为温度及衍生时间等条件的不同产生的实验误差。

4 结束语

药品安全事关人民群众身体健康和生命安全,其中氨基酸的检测是药品质量安全的重要一部分。随着人们对药品安全重

视程度的提高,药品中的氨基酸含量检测也逐渐受到重视,氨基酸检测技术愈加先进,氨基酸的分析方法向着快捷准确的方向发展。近些年,各种氨基酸分析仪相继问世,相较于其他传统检测方法,氨基酸分析仪检测法更适用于药品中的氨基酸检测,尤其是制药厂、食品药品监督管理局等有大量样品检测需求的单位。氨基酸分析仪可以简化检测步骤,同时完成大批量、高通量的药物样品的氨基酸检测。氨基酸分析仪是药品检测研究中不可缺少的仪器手段,随着氨基酸分析仪的检测技术的提高,使用氨基酸分析仪检测药品中的氨基酸含量将成为一种趋势,其应用将越来越广泛。

参考文献

- [1] 贾弘提.生物化学与分子生物学[M].北京:人民卫生出版社,2015:11-13.
- [2] 刘惠文.柱前和柱后衍生高效液相色谱分析氨基酸方法进展与评述[J].氨基酸和生物资源,1995,17(02):50-55.
- [3] 邢健,李巧玲,耿涛华,等.氨基酸分析方法的研究进展[J].中国食品添加剂,2012,(05):187-191.
- [4] 陈志慧.氨基酸分析技术的综述[J].广东化工,2004,(02):69-71.
- [5] MOORE S, SPACKMAN DH, STEIN WH. Analysis of amino acid by chromatography [J]. Anal Chem, 1958, 30: 1185.
- [6] 周梦怡,马小芳.氨基酸分析前处理水解技术比较研究[J].实验室科学,2018,21(05):75-78.
- [7] 佟俊婷.氨基酸分析仪检出限以及分离度不确定的评定[J].品牌与标准化,2023,(02):36-38.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准食品中氨基酸的测定:GB 5009.124—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [9] 邵天舒,郭雷,李潇,等.氨基酸分析仪测定复方氨基酸注射液(18AA-II)中游离氨含量[J].中国药师,2021,24(11):2103-2106.
- [10] 苏芳,高春,代红.阿波莫斯颗粒剂含量测定方法的研究[J].首都医药,2002,(07):72.
- [11] 何虹,谭菊英,刘庄蔚.口服五维赖氨酸葡萄糖中盐酸赖氨酸含量的研究[J].化工设计通讯,2023,49(06):200-202.
- [12] 段秀俊,刘培,杨超,等.雀脑药材的质量标准提升研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(08):2831-2838.
- [13] QURESHI MN, STECHER G, BONN GK. Quality control of herbs: Determination of amino acids in *Althaea officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Taraxacum officinale* [J]. Pak J Pharm Sci, 2014, 27(03):459-462.
- [14] 肖云娜,梁伟娜.全自动氨基酸分析仪法同时测定复方 α -酮酸片中的 5 种氨基酸含量[J].分析仪器,2021,(06):26-31.