DTDPA-OPA 联合柱前衍生化 HPLC 测定普卡那肽原料药中的氨基酸比值

潘　静，杨欣茹，李铁健，韩忠丽，张贵民 *

（鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400）

摘要：采用 HPLC 法，以二硫代二丙酸（DTDPA）和邻苯二甲醛（OPA）联合作为柱前衍生化试剂，建立了普卡那肽原料药中氨基酸比值的测定方法。结果显示，普卡那肽中各氨基酸的定量限为 0.006 9 ～ 0.012 7 μmol/mL，检测限为 0.003 5 ～ 0.006 3 μmol/mL，在定量限至测定浓度的 200%范围内，线性关系良好（$r \geqslant 0.999\ 6$）；溶液稳定性 RSD（n=9）≤ 4.058%；氨基酸比值的精密度 RSD（n=12）≤ 2.41%；平均回收率（n=9）在 97.32%～ 101.96%，RSD ≤ 1.22%；检测条件发生微小变化时，氨基酸比值的 RSD（n=16）≤ 1.61%。该法专属性强、准确、高效，可用于普卡那肽氨基酸比值的测定。

关键词：普卡那肽；氨基酸比值；柱前衍生化；HPLC

中图分类号：R917；R975^{+}.3　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2024）08-1129-06

引用：潘　静 , 杨欣茹 , 李铁健 , 等．DTDPA-OPA 联合柱前衍生化 HPLC 测定普卡那肽原料药中的氨基酸比值［J］．中国医药工业杂志 , 2024, 55（8）: 1129-1134．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.08.014

Determination of Amino Acid Ratios in Plecanatide by DTDPA-OPA Combined with Pre-column Derivatization HPLC

PAN Jing, YANG Xinru, LI Tiejian, HAN Zhongli, ZHANG Guimin*

(*National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Linyi 273400*)

ABSTRACT: An pre-column derivatization HPLC method with dithiodipropionic acid（DTDPA）and *o*-phthalaldehyde（OPA）was established to determine the amino acid ratios in plecanatide. The results showed that the quantitative limits were 0.006 9 – 0.012 7 μmol/mL, the detection limits were 0.003 5 – 0.006 3 μmol/mL. The linearity and solution stability of all amino acids were good with minimum r of 0.999 6 and the maximum RSD（n=9）of 4.058%. The precision was good with the maximum RSD（n=12）of 2.41%. The mean recoveries（n=9）were 97.32% – 101.96%, the maximum RSD was 1.22%. In case of detection parameters slight change, the durability was good with the maximum RSD（n=16）of 1.61%. The established method is specific, accurate and efficient, which can be used for determination of the amino acid ratios of plecanatide.

Key Words: plecanatide; amino acid ratio; pre-column derivatization; HPLC

慢性特发性便秘属于下消化道动力学障碍性疾病，发病与结肠、肛门直肠动力学及精神心理异常有关，也是困扰中老年人群的常见多发病，在不同程度上影响现代人的工作和生活质量[1]。普卡那肽（plecanatide）的氨基酸组成序列为 H-Asn-Asp-Glu-Cys-Glu-Leu-Cys-Val-Asn-Val-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Leu-OH，最初由美国 Callisto 制药公司研制，后转让给 Synergy 制药公司开发，于 2017 年 1 月 19 日经 FDA 批准上市[2]。它是促尿钠排泄的鸟苷酸环化酶 C 受体激动药，是含有双二硫键、连接 16 个氨基酸的环状多肽，能调节胃肠道中的酸碱离子，诱导

收稿日期：2023-12-12

基金项目：山东省重大科技创新工程项目“多肽药物的高效绿色合成技术的研发及规模化应用”（2019JZZY010516）

作者简介：潘　静（1986—），女，硕士，从事多肽药物研究。

通信作者：张贵民（1969—），男，研究员，从事药物研究及工程化研究。

E-mail：lunanzhangguimin@163.com

液体转运进入胃肠道，增加胃肠道的蠕动，且不良反应小，安全、有效，适用于治疗成人慢性特发性便秘[3]。

建立准确、可靠的氨基酸比值分析方法是一项有意义的工作[4]。氨基酸比值的测定是多肽药物质量控制的重要环节，也是多肽原料药质量标准的重要组成部分。测定多肽药物的氨基酸理论个数比，能从侧面佐证多肽的结构。因此，对氨基酸比值进行分析，可为多肽的结构确证提供理论指导。采用基于离子交换色谱的氨基酸分析仪直接测定氨基酸比值是目前的主流方法，此法可同时对一级氨基酸和二级氨基酸进行检测，无需衍生化，直接进样的分离效果好、灵敏度高、操作简单。但是，氨基酸分析仪专属性强、价格昂贵，大幅限制了该法的推广和应用[5—6]。

衍生化法是将氨基酸接上发光或发色基团，再进行定性/定量分析，包括柱前衍生化和柱后衍生化。柱后衍生化条件的自由度有所限制，衍生化反应要在特定反应器中进行，常造成色谱峰展宽，使分离度降低，过量试剂或试剂水解产物还可能干扰检测结果，通常需要使用特定的设备配件。柱前衍生化法[7]对仪器的要求相对较低，优点突出，普适性广，应用更为广泛。常用的柱前衍生化 HPLC 测定氨基酸的方法有 AQC 法（6- 氨基喹啉 -*N*- 羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯）、DNFB 法（2,4- 二硝基氟苯）、DABS 法（磺酰氯二甲胺偶氮苯）、PITC（异硫氰酸苯酯）、OPA-FMOC 法（邻苯二甲醛和 9- 芴甲基氯甲酸酯）和 BS-PCR 法（亚硫酸氢盐聚合酶链式反应）等[8—9]。其中，使用 OPA 可实现在线自动化衍生（OPA 衍生化的反应方程式如图 1 所示）。

普卡那肽序列中含有半胱氨酸，酸水解后的产物大部分为胱氨酸，少量为半胱氨酸，后者不稳定，与胱氨酸可以相互转化[10]，因此定量十分困难。普卡那肽的氨基酸比值测定具有一定的难度，有研究者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（DTDPA 衍生化的反应方程式如图 2 所示）[11]。有研究者使用 DTDPA 与 PITC 联合柱前衍生化准确测定了复方氨基酸注射液中半胱氨酸及其他 17 种氨基酸[12]，但样品制备较烦琐，需先去除剩余的衍生试剂，并且即便严格控制操作过程，存在于样品中的痕量 PITC 试剂也会缩短分析柱的寿命。

本研究采用 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 OPA 进行柱前在线衍生化，通过优化 HPLC 条件，使之与其他氨基酸有效分离，采用内标法测定普卡那肽的氨基酸比值，以期为含有半胱氨酸或胱氨酸及其他一级氨基酸的多肽药品中氨基酸比值的测定提供参考。

1　仪器与试药

1260 型高效液相色谱仪（含紫外检测器，美国安捷伦

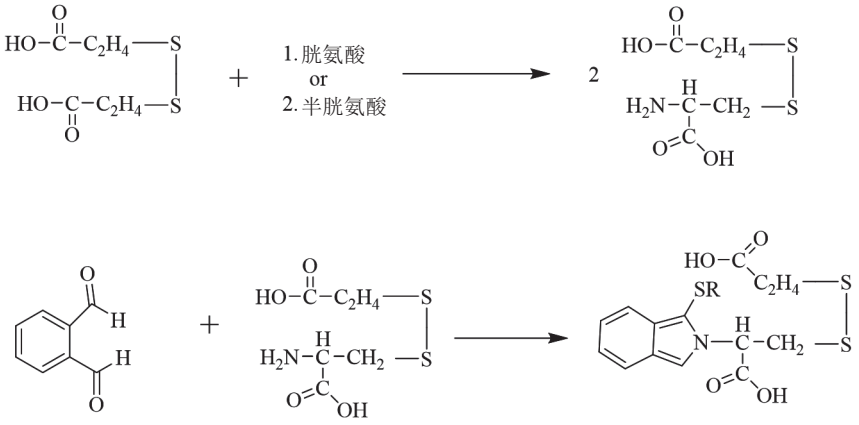


图 1　DTDPA 衍生化的反应方程式

Fig.1　DTDPA Derivative Reaction Equations

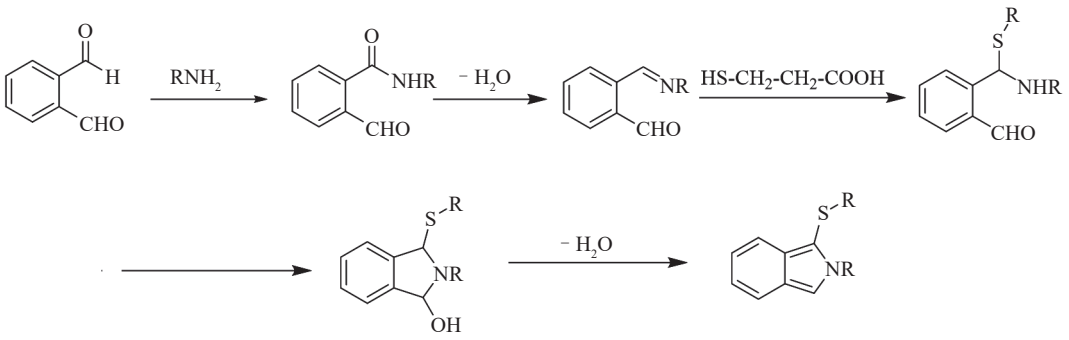


图 2 OPA 衍生化的反应方程式

Fig.2 OPA Derivative Reaction Equation

公司）；XSR105DU/A、XPR10型电子天平和S210型pH计（瑞士梅特勒 - 托利多公司）。

L- 门冬氨酸（批号 140691-201602）、谷氨酸（批号 140690-201604）、甘氨酸（批号 140689-202006）、苏氨酸（批号 140682-202103）、胱氨酸（批号 140632-201903）、丙氨酸（批号 140680-202005）、缬氨酸（批号 140681-201703）、亮氨酸（批号 140687-201905）的对照品均来自中国食品药品检定研究院，缬氨酸含量为 99.5%，甘氨酸含量为 100.0%，其他氨基酸含量均为 99.9%；L- 正缬氨酸（内标，国药集团化学试剂有限公司，含量≥ 98.0%，批号 20190723）；普卡那肽原料药（鲁南新时代生物技术有限公司，含量为 99.6%、99.9%、98.9%，批号为 220601、220701、220702）；DTDPA（日本 TCI 公司，分析纯，批号 BCCH8937）；OPA（规格 10 mg/mL，批号 BCCH8937）、硼酸盐缓冲液（批号 BCCJ0847，pH 10.2）均购于美国安捷伦公司；乙腈、甲醇为 HPLC 级，磷酸氢二钠、十水合四硼酸钠、磷酸、氢氧化钠均为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse AAA 柱（4.6 mm× 150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为 10 mmol/L 磷酸氢二钠 +10 mmol/L 四硼酸钠溶液（用磷酸调至 pH 7.8），B 为甲醇、乙腈和水（体积比 45 ∶ 45 ∶ 10），梯度洗脱（0—0.35 min，A 95%；0.35—7.8 min，A 95%—67%；7.8—13.4 min，A 67%—43%；13.4—13.5 min，A 43%—0；13.5—17.5 min，A 0；17.5—17.6 min，A 0—95 %；17.6—20 min，A 95 %）；检测波长 338 nm；流速 2.0 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液配制

DTDPA 溶液：精密称取 DTDPA 1 g，用硼酸盐缓冲液溶解，并用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 10.4，即得 100 mg/mL 的 DTDPA 溶液。

空白溶剂：取纯化水 0.5 mL，置离心管中，加入 DTDPA 溶液 0.5 mL，置 80 ℃水浴中加热 60 min，冷却至室温后作为空白溶剂。

氨基酸对照品溶液：精密称取 L- 门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸、胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、L- 正缬氨酸（内标）对照品适量，用水稀释（L- 门冬氨酸、谷氨酸、胱氨酸先用 0.1 mol/L 盐酸溶解后，再用水稀释），作为各氨基酸贮备溶液；精密移取各氨基酸贮备溶液，加水稀释制成每 1 mL 中含各氨基酸 0.4 μmol 的混合溶液，取此溶液 0.5 mL，置离心管中，加入 DTDPA 溶液 0.5 mL，置 80 ℃水浴中加热 60 min，冷却至室温后作为氨基酸对照品溶液。

供试品溶液：精密称取普卡那肽 16.8 mg，置顶空瓶中，加入 6 mol/L 盐酸 5 mL，封口，置 110 ℃烘箱中加热 24 h 后，启封，减压冻干。取冻干后的样品，加水溶解，再加入内标贮备溶液，使内标的最终浓度为 0.4 μmol/mL；取此溶液 0.5 mL，置离心管中，加入 DTDPA 溶液 0.5 mL，置 80 ℃水浴中加热 60 min，冷却至室温后作为供试品溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验

取“**2.2**”项下的空白溶剂、氨基酸对照品溶液

和供试品溶液适量，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果如图 3 所示，空白溶剂对氨基酸的测定无干扰；氨基酸对照品溶液中，各氨基酸的分离度均大于 1.5；供试品溶液中的其他杂质对各氨基酸的测定无干扰。

2.3.2 稳定性试验

按“**2.2**”项下方法配制氨基酸对照品溶液和供试品溶液，分别于室温放置 0、2、4、6、8、10、12、24、71 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，氨基酸对照品溶液中各氨基酸峰面积与内标峰面积的比值 RSD（n=9）≤ 4.058%，供试品溶液中各氨基酸峰面积与内标峰面积的比值 RSD（n=9）≤ 3.837%，表明氨基酸对照品溶液及供试品溶液于室温放置 71 h 内稳定。

2.3.3 定量限与检测限

精密移取“**2.2**”项下的各氨基酸贮备溶液适量，加水逐级稀释，再加入等量 DTDPA 溶液，置 80 ℃水浴中加热 60 min，放冷后按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以信噪比 $S/N \geqslant 10$ 时的浓度作为定量限，以 $S/N \geqslant 3$ 时的浓度为检测限。取定量限溶液重复进样 6 针，检测限溶液重复进样 3 针。结果如表 1 所示。

2.3.4 线性试验

精密移取“**2.2**”项下的各氨基酸贮备溶液，加水稀释，制成各氨基酸定量限和检测浓度的 20%、50%、80%、100%、150%、200%的系列浓度线性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以各氨基酸峰面积与内标峰面积的比值（y）为纵坐标、浓度［c/（μmol·mL^{-1}）］为横坐标进行线性回归。所得回归方程和线性范围如表 2 所示。

表 1　定量限与检测限结果

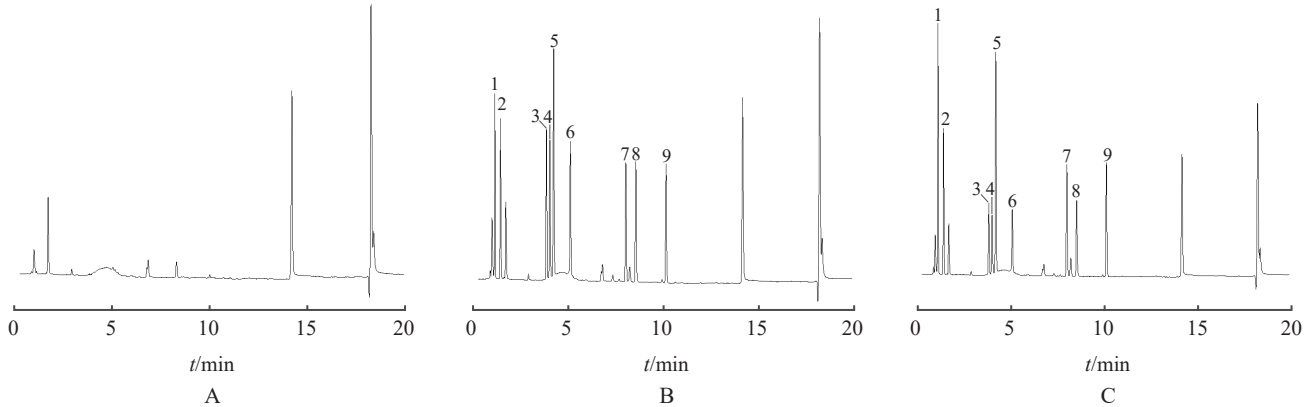
Tab.1　Results of Quantitative Limits and Detection Limits

待测组分	定量限浓度 /（μmol·mL^{-1}）	峰面积 RSD/%	检测限浓度 /（μmol·mL^{-1}）
L- 门冬氨酸	0.010 0	4.43	0.005 0
谷氨酸	0.010 2	6.21	0.005 1
甘氨酸	0.012 5	5.59	0.006 3
苏氨酸	0.012 7	2.19	0.006 3
胱氨酸	0.006 9	3.76	0.003 5
丙氨酸	0.012 5	3.96	0.006 2
缬氨酸	0.012 7	4.22	0.006 3
亮氨酸	0.012 5	5.62	0.006 3

表 2　回归方程和线性范围

Tab.2　Regression Equations and Linear Ranges

待测组分	回归方程	线性范围 /（μmol·mL^{-1}）	r
L- 门冬氨酸	y=4.533 1c − 0.045 1	0.01 ～ 1.21	0.999 9
谷氨酸	y=4.822 9c+0.008 0	0.01 ～ 0.84	0.999 9
甘氨酸	y=4.560 6c+0.051 9	0.01 ～ 0.42	0.999 8
苏氨酸	y=4.516 7c+0.026 2	0.01 ～ 0.42	0.999 6
胱氨酸	y=6.702 4c+0.035 1	0.01 ～ 0.81	0.998 7
丙氨酸	y=4.650 8c − 0.037 7	0.01 ～ 0.41	0.999 9
缬氨酸	y=4.244 1c+0.019 2	0.01 ～ 0.81	0.999 9
亮氨酸	y=4.814 8c+0.014 6	0.01 ～ 0.80	0.999 9



A—空白溶剂；B—氨基酸对照品溶液；C—供试品溶液。

1—L- 门冬氨酸；2—谷氨酸；3—甘氨酸；4—苏氨酸；5—胱氨酸；6—丙氨酸；7—缬氨酸；8—L- 正缬氨酸；9—亮氨酸。

图 3　典型色谱图

Fig.3　Typical Chromatograms

2.3.5 准确度试验

照“**2.2**”项下氨基酸对照品溶液的制备方法，精密移取各氨基酸贮备溶液适量，加水稀释，制成氨基酸对照品溶液 2 份及各氨基酸检测浓度的 80%、100%、120%的准确度溶液，每个浓度各 3 份，照“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算准确度及 RSD，结果如表 3 所示。

表 3 准确度试验结果（*n*=9）

Tab.3 Results of the Accuracy Test（*n*=9）

待测组分	准确度 /%	RSD/%
L- 门冬氨酸	97.32 ～ 100.05	0.87
谷氨酸	97.75 ～ 100.69	1.15
甘氨酸	97.46 ～ 101.31	1.22
苏氨酸	97.76 ～ 100.77	1.19
胱氨酸	99.04 ～ 101.96	0.94
丙氨酸	98.06 ～ 100.73	1.08
缬氨酸	97.79 ～ 100.41	0.95
亮氨酸	98.50 ～ 100.77	0.71

2.3.6 精密度试验

照“**2.2**”项下氨基酸对照品溶液、供试品溶液的制备方法，平行制备 2 份氨基酸对照品溶液和 6 份供试品溶液，更换仪器和操作人员，同法配制中间精密度溶液，照“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，12 份测试溶液中各氨基酸比值的 RSD（*n*=12）为 0.26%～ 2.41%，表明本法精密度良好。

2.3.7 耐用性试验

照“**2.2**”项下氨基酸对照品溶液和供试品溶液的制备方法，配制氨基酸对照品溶液和供试品溶液，并照“**2.1**”项下色谱条件，进行微调整（柱温 ±2 ℃，流速 ±0.1 mL/min，流动相 pH±0.1，流动相 B 组成改变，水浴时间 ±10 min，水浴温度 ±10 ℃，检测波长 ±2 nm，更换色谱柱批号）进样测定。结果显示，不同色谱条件下，各氨基酸比值的 RSD（*n*=16）为 0.28%～ 1.61%，表明本法耐用性良好。

2.4 样品检测

取 3 批普卡那肽样品，照“**2.2**”项下方法制备氨基酸对照品溶液、供试品溶液，照“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算各氨基酸比值，结果如表 4 所示。其中，普卡那肽的氨基酸序列为 H-Asn-Asp-Glu-Cys-Glu-Leu-Cys-Val-Asn-Val-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Leu-OH，普卡那肽序列中谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸的总个数为 8。因为这几种氨基酸相对稳定，故选择这几种氨基酸来计算。

表 4 样品测定结果

Tab.4 Test Results of the Samples

待测组分	批号			标准
	220601	220701	220702	以谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸总物质的量的 1/8 作为 1，计算各氨基酸的相对比值
L- 门冬氨酸	3.14	3.14	3.14	2.7 ～ 3.3
谷氨酸	2.00	2.00	2.00	1.8 ～ 2.2
甘氨酸	1.00	1.00	1.00	0.9 ～ 1.1
苏氨酸	0.95	0.95	0.96	0.9 ～ 1.1
胱氨酸（相当于半胱氨酸[1)]）	1.93 (3.86)	1.95 (3.90)	1.94 (3.88)	3.6 ～ 4.4
丙氨酸	0.98	0.98	0.98	0.9 ～ 1.1
缬氨酸	1.98	1.98	1.97	1.8 ～ 2.2
亮氨酸	2.04	2.04	2.04	1.8 ～ 2.2

注：[1)]1 mol 的胱氨酸相当于 2 mol 的半胱氨酸，可通过胱氨酸来计算半胱氨酸的含量，结果需要乘以 2。

3 讨论

ChP 2020 年版新增了多肽类氨基酸药物的氨基酸分析方法，包括 4 种柱前衍生化方法，分别为 PITC 法、AQC 法、OPA-FMOC 法及 DNFB 法。其中，PITC 法和 AQC 法均需要手动衍生化，步骤烦琐、耗时、误差较大；DNFB 法中所用的 DNFB 属易爆、剧毒物质，有较强的致癌性，且对色谱柱的要求较高，易损坏色谱柱，故除另有规定外，一般不采用此方法。OPA-FMOC 法流动相中含有三乙胺和 THF，系统较难平衡，且最好专柱专用，分析时间也较长（53 min）。本研究参考安捷伦公司提供的氨基酸分析方法，并进行一系列优化，得到了效果较好的测定方法。半胱氨酸水溶液极不稳定，在与其他氨基酸共存的条件下，含硫氨基酸因易氧化，导致定量分析困难，此外，半胱氨酸的巯基与衍生化试剂中的硫醇化合物会发生竞争反应，造成被测组分含量损失而无法反映样品中的真实结果[13]。

一般需要使用强氧化剂将半胱氨酸氧化为稳定

的化合物后再进行定量测定，目前多采用先以过甲酸氧化为磺基丙氨酸、再用氨基酸分析仪的方式进行分析。但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[11]。并且，过甲酸氧化步骤烦琐、时间长、不易操作，HPLC 法大多使用 Waters 衍生化试剂包，均需要手动操作，反应活性差、速度慢，受试剂影响较大，存在一定的误差。

本研究采用 DTDPA 为氧化剂，将半胱氨酸和胱氨酸氧化成为稳定的氨基酸复合物，与 OPA 联合作为柱前衍生化试剂使用。OPA 能在常温下迅速与一级氨基酸反应 (30 s)，生成具有较强荧光和紫外吸收的吲哚衍生物[14]，从衍生化到检测的过程能全程自动化，操作简单、用时短、试剂用量少，减少了人为误差，可准确定量产品中半胱氨酸的含量，且 DTDPA 对其他氨基酸基本没有影响，加入内标物质后校正了物理和化学损失，从而提高了分析的准确性和可靠性，为企业质控带来方便，也为普卡那肽的氨基酸比值检测提供了准确、可靠的方法。

参考文献：

[1] AMOLSHARM A, ANAM A H, JIGAR B, *et al*. Profile of plecanatide in the treatment of chronicidiopathic constipation: design, development, and place in therapy [J]. *Clin Exp Gastroenter*, 2019, **12**: 31-36.

[2] Al-SALAMA Z T, SYED Y Y. Plecanatide: first global approval [J]. *Drugs*, 2017, **77**(5): 593-598.

[3] SATISH S C R. Plecanatide: a new guanylate cyclase agonist for the treatment of chronicidiopathic constipation [J]. *Ther Adv Gastroenterol*, 2018, **11**: 1-14.

[4] 丁金国, 李晓倩, 黄臻辉, 等. 柱前衍生高效色谱法测定血管紧张素的氨基酸组成 [J]. 上海医药, 2018, **39**(11): 98-102.

[5] 戴　红, 张宗才, 张新申. 氨基酸分析的检测方法评述 [J]. 皮革科学与工程, 2004, **14**(3): 39-43.

[6] 高永清. 直接分析氨基酸的两种方法 [J]. 分析仪器, 2003, **3**: 40-43.

[7] 吕莹果, 张　晖, 孟祥勇, 等. 氨基酸分析测定及衍生化方法 [J]. 粮食与油脂, 2009, **7**: 35-38.

[8] 杨美菊, 彭　清, 郑正春, 等. HPLC 测定转移因子注射液中游离氨基酸的含量方法的探讨 [J]. 中国现代实用医学杂志, 2007, **6**(5): 11.

[9] 唐志毅, 肖路延, 罗　玲, 等. 一种新的高效液相色谱法选择性测定尿羟脯氨酸 [J]. 中华医学检验杂志, 1999, **22**(4): 210-212.

[10] BARKHOLT V, JENSEN A L. Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive [J]. *Anal Biochem*, 1989, **177**: 318-322.

[11] 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): 304-307.

[12] 阚微娜, 滕艳坤, 杨宏伟, 等. 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 [J]. 中国药房, 2014, **25**(12): 1122-1125.

[13] 申兆栋, 黄冬梅, 孔　聪, 等. HPLC 法在线衍生测定中华绒螯蟹中 17 种氨基酸含量 [J]. 分析试验室, 2021, **40**(5): 552-557.

[14] 陈鹭颖. OPA-Fmoc 联用柱前衍生法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量 [J]. 海峡药学, 2001, **13**(4): 26-27.