

使用氨基酸分析仪测定多肽药物中氨基酸含量及比值

LC-451

摘要：本文参考《中华人民共和国药典》（2020年版）第一增补本（四部）中“9120 氨基酸分析指导原则”的相关条件和要求，采用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了一种自动柱后衍生高效液相色谱法测定多肽药物中 17 种氨基酸含量及比值的分析方法。实验结果表明：17 种氨基酸在 20~500 nmol/L 线性浓度范围内，相关系数均大于 0.999，准确度为 96.1~104.1%。精密度实验中，50 nmol/L 的 17 种氨基酸标准溶液保留时间 RSD% 为 0.01~0.15%，峰面积 RSD% 为 0.26~2.57%。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性佳，分离效果好，可为多肽药物中氨基酸的测定提供参考。

关键词：多肽药物 柱后衍生 氨基酸比值 钠型

技术特点：

- ❖ LC-16AAA 氨基酸分析仪结合配套试剂包可以实现多肽药物水解液中多种氨基酸的全自动柱后衍生，方便快捷，减少人为误差；
- ❖ 相较于柱前衍生方法，LC-16AAA 柱后衍生法基质干扰小。

多肽药物市场近年来快速增长，未来发展潜力巨大。凭借高靶向性、低毒性等优势，它们在抗肿瘤、代谢疾病和免疫调节等领域展现出广泛应用前景。随着生物技术的不断进步和临床需求的增加，全球多肽药物市场规模预计将在未来几年显著扩大，成为医药行业的重要增长点。

多肽药物的氨基酸含量及比值测定对于确保药物质量至关重要，它能够验证药物的氨基酸组成是否符合预期，监控生产过程中的一致性，检测药物的纯度，评估其稳定性，并为药物研发提供支持。此外，

该检测还帮助满足法规要求，确保药物的安全性，并提供有关药物生物活性的关键信息。

本实验参考《中华人民共和国药典》（2020年版）第一增补本（四部）中“9120 氨基酸分析指导原则”，采用 LC-16AAA 氨基酸分析仪结合配套试剂包建立了一种高效液相色谱法测定多肽药物中 17 种氨基酸含量及比值的分析方法。该方法自动化程度高，不易受基质干扰，且分离效果好、重复性佳，结果准确可靠。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A
输液泵：LC-16×3
柱温箱：CTO-16L
鼓泡单元：DGU-10B
检测器：SPD-16

脱气机：DGU-20A_{5R}
自动进样器：SIL-16
高温反应箱：CRB-40
切换阀：FCV-11AL
色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Na (100×6.0 mm I.D., 5 μm)
(SGLC, P/N: S228-18837-91)

捕 氨 柱 : Shim-pack ISC-30 /S0504 Na (50×4.0 mm I.D.)
(SGLC, P/N: S228-14206-91)

流 动 相 : 钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C

衍 生 试 剂 : 茚三酮溶液

流 速 : 0.6 mL/min 衍生液流速 : 0.2 mL/min

柱 温 : 60°C 衍生反应温度 : 130°C

进 样 体 积 : 20 μL 检 测 波 长 : 570 nm/440 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度 0%, 洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B.Conc	0
13.00	泵	B.Conc	7
17.20	泵	B.Conc	8
17.21	泵	B.Conc	11
20.80	泵	B.Conc	11
20.81	泵	B.Conc	50
22.00	泵	B.Conc	58
22.01	泵	B.Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B
29.30	泵	B.Conc	100
29.31	泵	B.Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A
35.00	泵	Total Flow	0.6
36.50	泵	Total Flow	0.7
43.30	泵	Total Flow	0.7
44.00	泵	Total Flow	0.6
48.00	控制器	Stop	

注: SV(PumpA) 表示 A 泵溶剂切换阀, “值” 中选择 A 和 B 代表不同的流动相。

1.3 标准品溶液与试样的制备

标准品溶液的制备: 取适量 2.5 μmol/mL 的 17 种氨基酸混标储备液, 用流动相 A 逐级稀释为 20、50、100、200 和 500 nmol/mL 的系列混合标准溶液。

试样制备: 取多肽药物 TKL3250 约 2.529 mg, 至水解管中, 加入 6 mol/L 盐酸溶液 (含 1.0% 苯酚) 1 mL, 密封, 于 110°C 条件下水解 24 小时, 氮气挥干; 随后在多肽水解管中加入 4 mL 流动相 A 溶解样品, 振荡混匀后, 吸取溶液通过 0.22 μm 水系过滤器后, 转移至仪器进样瓶中, 供测定用。

■ 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

标准品溶液图谱见图 1, 除脯氨酸 (Pro) 采用 440 nm 波长检测, 其余 16 种氨基酸均采用 570 nm 波长检测。结果显示, 17 种氨基酸分离度均满足要求。此方法 17 种氨基酸在 35 分钟内分离完全, 分析效率高。

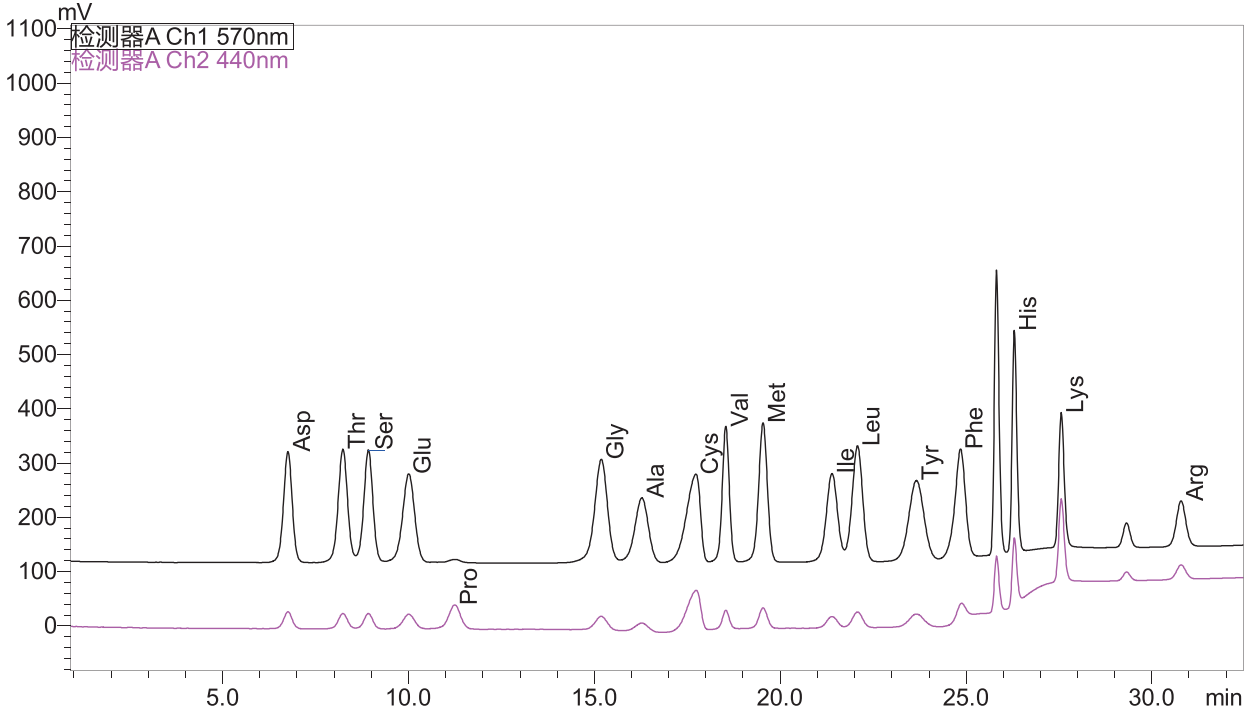


图 1 17 种氨基酸标准溶液 (200 nmol/mL) 图谱

2.2 线性

取系列浓度标准品溶液进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，部分氨基酸校准曲线如图 2 所示。17 种氨基酸在 20~500 nmol/L 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999，准确度为 96.1~104.1%，线性方程、相关系数结果见表 2。

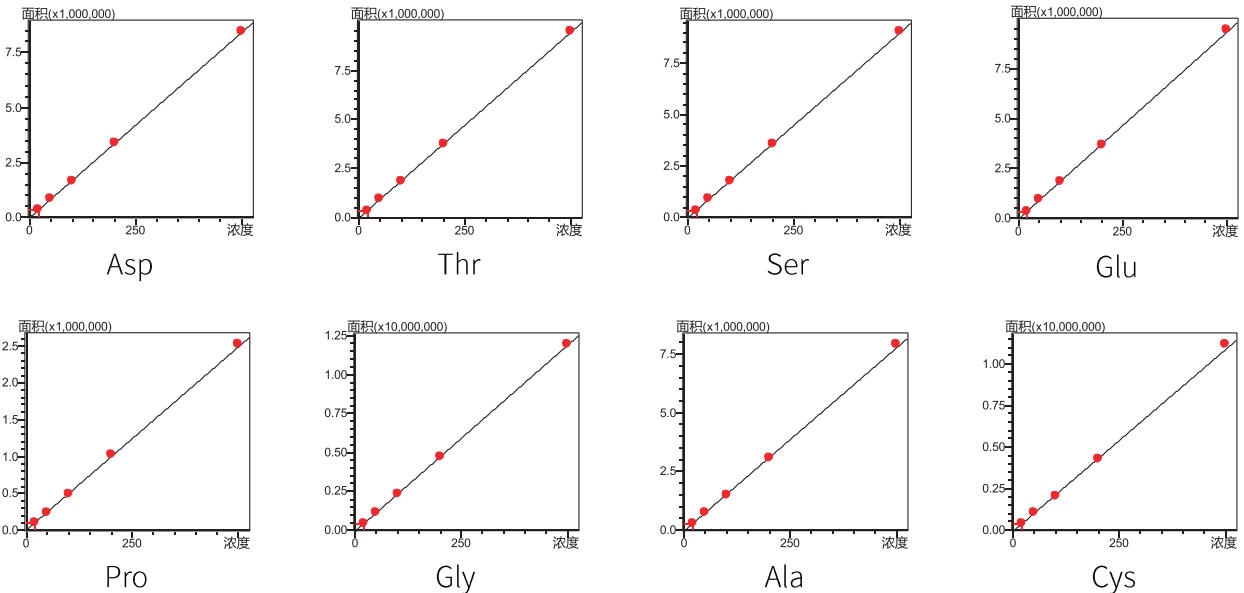


图 2 部分校准曲线

表 2 线性结果

序号	氨基酸名称	简称	标准曲线	相关系数 R	准确度 %
1	天冬氨酸	Asp	$Y = (16852.8)X + (-10336.9)$	0.9999	98.5~100.6
2	苏氨酸	Thr	$Y = (18886.7)X + (-18219.2)$	0.9999	98.5~100.7
3	丝氨酸	Ser	$Y = (17974.6)X + (-16622.6)$	0.9999	98.4~100.9
4	谷氨酸	Glu	$Y = (18638.9)X + (-21499.0)$	0.9999	98.1~101.5
5	脯氨酸	Pro	$Y = (4957.12)X + (4448.33)$	0.9995	96.1~102.1
6	甘氨酸	Gly	$Y = (23821.3)X + (-53006.7)$	0.9999	98.7~101.1
7	丙氨酸	Ala	$Y = (15573.3)X + (-22293.7)$	0.9998	98.2~102.1
8	胱氨酸	Cys	$Y = (21787.2)X + (-53951.3)$	0.9997	97.4~103.1
9	缬氨酸	Val	$Y = (16877.5)X + (12037.4)$	0.9997	98.9~103.2
10	甲硫氨酸	Met	$Y = (21517.2)X + (-16551.9)$	0.9999	99.0~102.0
11	异亮氨酸	ILE	$Y = (17465.2)X + (-27619.2)$	0.9999	98.3~100.8
12	亮氨酸	Leu	$Y = (21549.7)X + (-16035.1)$	0.9999	98.8~101.0
13	酪氨酸	Tyr	$Y = (20815.3)X + (-10064.9)$	0.9998	98.3~102.5
14	苯丙氨酸	Phe	$Y = (20216.3)X + (-74757.2)$	0.9996	97.4~103.1
15	组氨酸	His	$Y = (17878.0)X + (29937.9)$	0.9997	97.9~102.4
16	赖氨酸	Lys	$Y = (13226.1)X + (-21901.8)$	0.9993	97.3~104.1
17	精氨酸	Arg	$Y = (7703.30)X + (-13006.2)$	0.9998	98.2~102.4

2.3 精密度分析

对 50 nmol/mL 标准溶液连续进样 6 次，考察仪器的精密度，重叠色谱图如图 3 所示；其中保留时间 RSD 值小于 0.15%，峰面积 RSD 值小于 2.57%，仪器精密度良好，具体结果如表 3 所示。

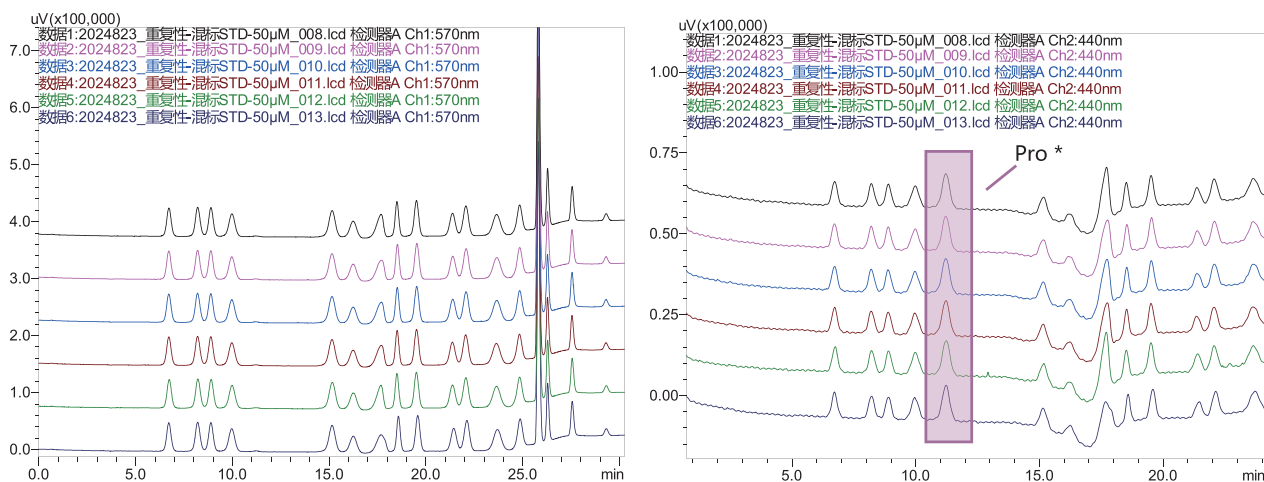


图 3 标准溶液重叠色谱图 (n=6)

表3 精密度结果 (n=6)

序号	氨基酸名称	RSD(%)	
		保留时间	峰面积
1	Asp	0.12	0.49
2	Thr	0.08	0.74
3	Ser	0.07	1.06
4	Glu	0.07	1.24
5	Pro	0.10	2.01
6	Gly	0.04	0.85
7	Ala	0.03	0.72
8	Cys	0.07	1.89
9	Val	0.15	2.57
10	Met	0.13	1.74
11	ILE	0.12	0.49
12	Leu	0.10	0.23
13	Tyr	0.08	0.86
14	Phe	0.05	1.10
15	His	0.01	0.32
16	Lys	0.02	0.26
17	Arg	0.01	0.31

2.4 样品分析结果

取样品 TKL3250 按 1.3 节处理，进样分析，其谱图如图 4 所示。根据“9120 氨基酸分析指导原则”氨基酸测定法——方法六中规定，一般选择水解处理中稳定的氨基酸用于多肽的定量；在本例中，有 6 种水解稳定的氨基酸被选做多肽定量，具体的氨基酸种类及多肽浓度如表 4 所示。同时指导原则也指出多肽样品的氨基酸比值由各氨基酸的浓度除以多肽的平均浓度获得，该样品各氨基酸浓度及比值分析结果如表 5 所示。

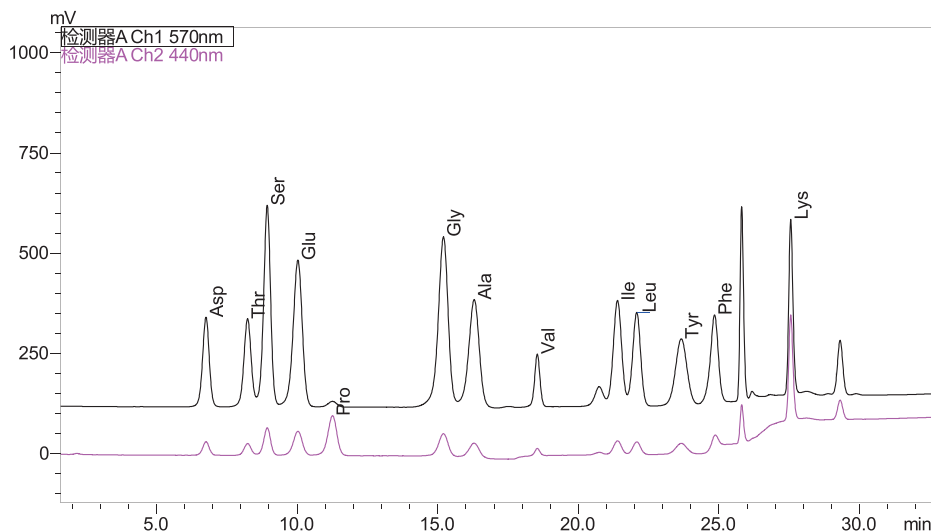


图4 样品 TKL3250 色谱图

表 4 水解稳定的氨基酸种类及多肽浓度

序号	氨基酸名称	各氨基酸浓度 (nmol/mL)	氨基酸残基理论值	多肽浓度 (nmol/mL)	
				计算值 *	相对误差 /%**
1	Asp	223.92	2	111.96	-0.74
2	Glu	456.06	4	114.02	1.08
3	Ala	465.85	4	116.46	3.25
4	Leu	219.19	2	109.60	-2.84
5	Phe	220.32	2	110.16	-2.34
6	Lys	343.71	3	114.57	1.57
多肽平均浓度		/	/	112.79	/

注: * 多肽浓度计算值 = 各氨基酸浓度 / 氨基酸残基理论值

** 相对误差 = (计算值 - 多肽平均浓度) / 多肽平均浓度 × 100%

表 5 样品各氨基酸浓度及比值分析结果

序号	化合物	各氨基酸浓度 (nmol/mL)	氨基酸比值	
			理论值	测得值
1	Asp	223.92	2	1.99
2	Thr	216.83	2	1.92
3	Ser	493.98	5	4.38
4	Glu	456.06	4	4.04
5	Pro	451.91	4	4.01
6	Gly	453.66	4	4.02
7	Ala	465.85	4	4.13
8	Val	104.98	1	0.93
9	Ile	322.83	3	2.86
10	Leu	219.19	2	1.94
11	Tyr	224.32	2	1.99
12	Phe	220.32	2	1.95
13	Lys	343.71	3	3.05

■ 结论

本文采用岛津氨基酸分析仪建立了一种自动柱后衍生高效液相色谱法测定多肽药物中 17 种氨基酸含量及比值的分析方法。结果显示线性、精密度结果均满足相关测定要求。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成, 分离效果好、重复性佳、结果准确可靠, 适用于多肽药物中氨基酸含量和氨基酸比值的分析。

岛津应用云

