· 质量分析研究 ·

AQC 柱前衍生高效液相色谱方法测定康复新液中游离氨基酸和总肽的含量

乔莉[1]，刘潇潇[1]，陈馥[1]，黄菁[2]，吴群悦[1]，刘珍[1]（1. 广东省药品检验所，广东 广州 510663；2. 湛江市食品药品检验所，广东 湛江 524008）

摘要：目的 应用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯（AQC）柱前衍生化技术，建立康复新液中游离氨基酸和总肽的高效液相色谱（HPLC）含量测定方法，并以总肽含量为指标对市售样品进行检测。**方法** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱）；60% 乙腈（A）-0.14 mol·L^{-1} 三水合乙酸钠溶液，用磷酸调节 pH 值至 5.0（B）为流动相，梯度洗脱；柱温：39 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}，检测波长：248 nm。**结果** 14 种氨基酸均能达到良好的分离效果；门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸分别在 2.0~99.7、3.4~168.5、2.8~139.6、4.0~201.4、4.8~238.1、6.7~336.9、3.3~167.5、9.7~487.3、4.1~202.5、4.4~221.6、5.4~270.5、3.3~166.8、4.8~240.8、4.7~236.6 μg·mL^{-1} 范围内呈现良好的线性关系（r=0.999 5~1.000 0）；游离氨基酸的平均加样回收率（n=6）为 86.8%~108.1%，RSD 为 2.8%~4.4%，总肽酸水解氨基酸的平均加样回收率（n=6）为 83.2%~102.7%，RSD 为 0.1%~3.1%；仪器精密度、重复性、稳定性实验的 RSD 均小于 5.0%。**结论** 该方法与现行质量标准的紫外分光光度法比较，二者测定的总氨基酸含量结果基本一致，但前者的专属性、重现性更优；以具有生物活性的总肽为质控指标，针对性更强，可为康复新液的质量评价提供更科学、合理的方法。

关键词： 康复新液；AQC 柱前衍生化；高效液相色谱法；游离氨基酸；总肽

中图分类号： R284.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783（2024）06-0870-08

doi： 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.06.012

Determination of Free Amino Acids and Total Peptides in *Kangfuxin* Liquid by HPLC Coupled with AQC Pre-column Derivatization

QIAO Li[1]，LIU Xiaoxiao[1]，CHEN Fu[1]，HUANG Jing[2]，WU Qunyue[1]，LIU Zhen[1]（1. Guangdong Institute for Drug Control，Guangzhou 510663 Guangdong，China；2. Zhanjiang Food and Drug Inspection Institute，Zhanjiang 524008 Guangdong，China）

Abstract：Objective To establish a method for determining the content of free amino acids and total peptides in *Kangfuxin* Liquid by HPLC coupled with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate（AQC）pre-column derivatization，and to evaluate the quality of commercial samples with total peptides as indexes. **Methods** HPLC separation was performed on Kromasil 100-5 C_{18} column with mobile phase comprising of 60% acetonitrile（A）and 0.14 mmol·L^{-1} sodium acetate trihydrate solution（adjusted to pH 5.0 with phosphoric acid）（B）in a gradient elution manner at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The column temperature was 39 ℃. The detection wavelength was 248 nm. **Results** 14 amino acids（aspartate，glutamic acid，serine，histidine，glycine，arginine，threonine，alanine，proline，valine，lysine，isoleucine，leucine，and phenylalanine）could achieve good separation，and present good linear relationship（r=0.999 5~1.000 0）in the concentration range of 2.0~99.7，3.4~168.5，2.8~

收稿日期： 2023-11-29

作者简介： 乔莉，女，副主任中药师，研究方向：中药质量控制与评价。Email：164091516@qq.com。并列第一作者：刘潇潇，女，博士，主任药师，研究方向：中药质量控制与评价。Email：cpulxx@126.com。通信作者：吴群悦，男，硕士，研究方向：药品检验与标准评价管理。Email：wuqunyue@gdidc.org.cn。刘珍，女，主管药师，研究方向：药品质量评价与管理。Email：1519893799@qq.com。

基金项目： 广东省医学科研基金项目（B2023258）；广东省药品监督管理局科技创新项目（2023YDZ03）。

139.6, 4.0~201.4, 4.8~238.1, 6.7~336.9, 3.3~167.5, 9.7~487.3, 4.1~202.5, 4.4~221.6, 5.4~270.5, 3.3~166.8, 4.8~240.8 and 4.7~236.6 μg·mL^{-1}, respectively. The average recoveries of free amino acids and hydrolyzed amino acids from total peptides were 86.8%~108.1% (n=6) and 83.2%~102.7% (n=6), with RSDs at 2.8%~4.4% and 0.1%~3.1%, respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were all lower than 5.0%. **Conclusion** As compared to ultraviolet spectrophotometry method for the current quality standard, the total amino acids content determined by this method is in consistent to UV. However, this method showed better specificity and reproducibility than UV. When total peptides with biological activity were used as quality control indicators, the pertinence of this method was strengthened. Our study may provide a scientific and reasonable method for the quality control of *Kangfuxin* Liquid.

Keywords: *Kangfuxin* Liquid; AQC pre-column derivatization; HPLC; free amino acids; total peptides

康复新液系我国药学专家李树楠教授历时数十年研制而成，为美洲大蠊提取物制成的单方制剂，可口服亦可外用[1]。其临床应用广泛，具有通利血脉、促进上皮细胞移行生长、加速组织修复及良好的抗菌、消炎、去腐生肌作用，内服可用于胃痛出血，消化性溃疡，以及肺结核的辅助治疗；外用可治疗金创、外伤、溃疡、瘘管、烧伤、烫伤、褥疮之创面[2]。该品种质量标准收载于部颁标准《中药成方制剂》（第十九册），其中定量质控项目为紫外分光光度法测定总氨基酸的含量[2]。但其存在两方面不足：其一，该方法利用氨基酸、肽、蛋白中-NH_2与茚三酮发生反应后生成蓝紫色的衍生物具有紫外吸收的原理，然而不同氨基酸与茚三酮衍生后所显颜色不尽相同，某些化合物（如一级胺化合物）对显色反应存在干扰，所以该方法的专属性不强，结果准确度欠佳；且茚三酮显色不稳定，受外界及试剂因素的影响很大，存在重现性较差的问题。其二，该方法以总氨基酸作为指标成分，而相关研究表明康复新液中小分子肽类成分具有较强的生物活性[3]，所以，方法的指标成分选择欠佳，而以活性成分小分子肽作为指标更具科学性和合理性。张利等[4]采用二硝基氟苯（DNFB）柱前衍生化法建立同时测定康复新液中5种主要游离氨基酸的含量测定方法。李奇娟等[5]采用柱前衍生化及化学模式识别法分析不同批次美洲大蠊以及其提取物和制剂康复新液中12种游离氨基酸的含量，但对于应用6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯（AQC）柱前衍生化法测定康复新液中游离氨基酸、总肽和总氨基酸的含量测定方法未见相关研究报道。

目前，动物药及相关制剂质量标准中涉及的主要检测方法大多为性状显微鉴别、化学反应鉴别、总氨基酸等含量测定，缺乏对临床功效对应的活性成分或有效部位进行质量控制。本研究参照《中国药典》2020年版“通则3123”“人免疫球蛋白中甘氨酸含量测定法”中AQC柱前衍生法[6]，采用高效液相色谱法，分别建立了康复新液中游离氨基酸和总肽的含量测定方法，并计算总氨基酸的含量（总氨基酸含量=游离氨基酸含量+总肽含量），以期为康复新液的质量控制提供更加准确、科学、合理的定量检测方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 LC-20AT高效液相色谱仪（日本岛津公司），包括CTO-20AC柱温箱、SIL-20AC自动进样器、SPD-20A紫外检测器；MSA225P-CE十万分之一电子天平（德国赛多利斯公司）；IQ 7000超纯水仪（美国密理博公司）；ED56干燥箱（德国宾德公司）；TW20水浴箱（德国优莱博公司）；G-L离心机（德国艾卡公司）。

1.2 试剂和样品 对照品门冬氨酸（Asp，批号：140691-201602，含量99.9%），谷氨酸（Glu，批号：140690-201604，含量99.9%），脯氨酸（Pro，批号：140677-202109，含量100.0%）、甘氨酸（Gly，批号：140689-202207，含量100.0%）、丙氨酸（Ala，批号：140680-202005，含量99.9%）、缬氨酸（Val，批号：140681-202204，含量99.8%）、赖氨酸（Lys，批号：140673-202211，含量100.0%）、异亮氨酸（Ile，批号：140683-202103，含量99.8%）、亮氨酸（Leu，批号：140687-202206，含量99.9%）、苯丙氨酸（Phe，批号：140676-201706，含量100.0%）、丝氨酸（Ser，

批号：140688-202104，含量100.0%）、组氨酸（His，批号：140855-202001，含量99.9%）、精氨酸（Arg，批号：140685-202108，含量100.0%）、苏氨酸（Thr，批号：140682-202103，含量99.9%）、γ-氨基丁酸（批号：110728-201707，含量99.8%），均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、盐酸为分析纯；水为超纯水；Waters AccQ-Fluor氨基酸衍生试剂包；康复新液样品，涉及4家生产企业共135批次（A1～A34，B1～B36，C1～C31，D1～D34）。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标溶液的制备　精密称取γ-氨基丁酸对照品适量，加水稀释至100 mL，制成质量浓度为2 mg·mL^{-1}的内标溶液A。再精密量取内标溶液A 4 mL，置250 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度为32 μg·mL^{-1}的内标溶液B。

2.1.2 混合对照品溶液的制备　精密称取门冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸对照品适量，至25 mL量瓶中，加2 mol·L^{-1}盐酸溶液适量使溶解；再加水稀释至刻度，摇匀，制成混合对照品贮备溶液。再精密量取上述混合对照品贮备溶液2 mL，置250 mL量瓶中，精密加入“2.1.1”项下的内标溶液A 2 mL，加水至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为19.93、33.70、40.50、47.62、97.46、44.32、54.10、33.36、48.15、47.33、27.92、40.27、67.38、33.50 μg·mL^{-1}的混合溶液，即得。

2.1.3 游离氨基酸供试品溶液的制备　精密吸取本品0.5 mL，置1 mL离心管中，精密加入内标溶液B 0.5 mL，涡旋混匀，以10 000 r·min^{-1}离心5 min（离心半径2 cm），取上清液，即得。

2.1.4 总肽供试品溶液的制备　精密吸取本品20 mL，通过已处理好的C_{18}固相萃取小柱（Waters Sep-Pak Vac，1 g），用水50 mL洗脱，弃去洗脱液；再用75%甲醇100 mL洗脱，收集洗脱液，水浴蒸干；残渣加水适量使溶解，并分次转移至10 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。精密吸取上述溶液2 mL至氨基酸水解管中，再精密加入水1 mL和盐酸2 mL，混匀，在110 ℃水解24 h，取出，放冷，转移至蒸发皿中，用少量水洗涤氨基酸水解管，洗液并入蒸发皿中，水浴蒸干；残渣加水适量使溶解，并分次转移至5 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀。精密吸取0.5 mL，置1 mL离心管中，精密加入内标溶液B 0.5 mL，涡旋混匀，以10 000 r·min^{-1}离心5 min（离心半径2 cm），取上清液，即得。

2.1.5 阴性样品溶液的制备　取辅料适量，加纯化水制成缺美洲大鳞乙醇提取物的阴性样品，再分别按“2.1.3”和“2.1.4”项下的制备方法制成游离氨基酸阴性样品溶液和总肽阴性样品溶液。

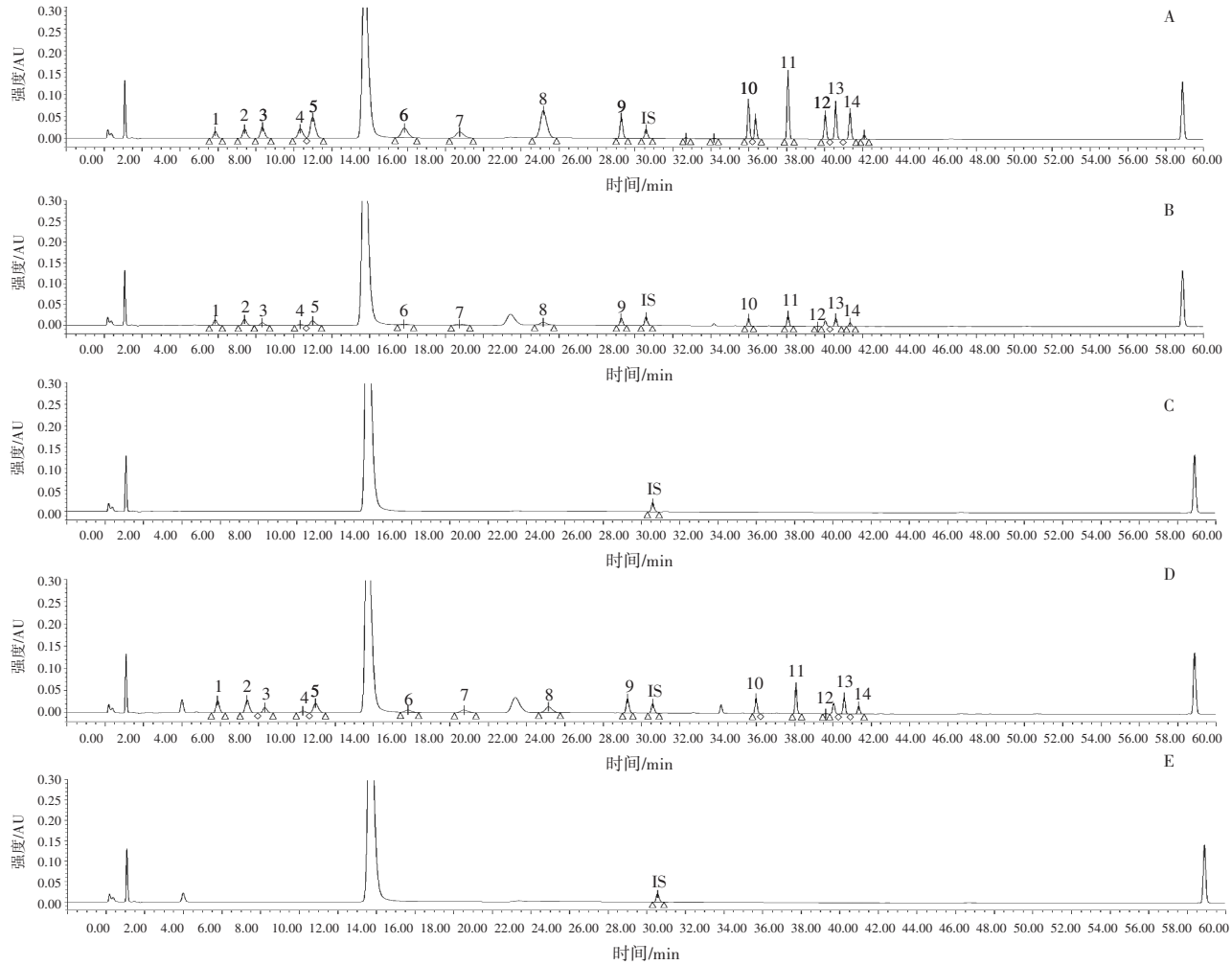
2.2 衍生化方法　分别精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液各10 μL，精密加入硼酸盐缓冲液70 μL，AQC溶液20 μL，马上涡旋混匀，放置1 min后，55 ℃衍生11 min，转移到衬管，即得。

2.3 色谱条件　Kromasil 100-5 C_{18}色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；以60%乙腈为流动相A，以0.14 mol·L^{-1}三水合乙酸钠溶液（用磷酸调节pH值至5.0）为流动相B，梯度洗脱（0~17 min，11.5%A；17~35 min，11.5%→41%A；35~50 min，41%→70%A；50~70 min，70%A）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：248 nm；柱温：39 ℃；取衍生后的溶液进样5 μL。

2.4 专属性试验　精密吸取混合对照品溶液、游离氨基酸供试品溶液、总肽供试品溶液、游离氨基酸阴性样品溶液和总肽阴性样品溶液各10 μL，按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件注入液相色谱仪，记录色谱图。结果显示阴性样品均无干扰，表明该方法专属性较好。结果见图1。

2.5 线性关系考察　分别精密吸取“2.1.2”项下的混合对照品贮备溶液0.4、0.8、2、8、4 mL，分别置250、250、250、250、50 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀；再分别精密取上述系列浓度的混合对照品溶液各0.5 mL，精密加入内标溶液B 0.5 mL，混匀，即得。再分别精密吸取加入内标溶液后的系列浓度的混合对照品溶液各10 μL，按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件注入液相色谱仪，以浓度比值（$C_{内标}/C_{样品}$）为横坐标，峰面积比值（$A_{内标}/A_{样品}$）为纵坐标进行线性回归，结果线性关系良好。见表1。

2.6 精密度试验　精密吸取“2.1.2”项下的混合对照品溶液10 μL，按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件，连续进样6次，记录各氨基酸的峰面积。结果门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨



注：A. 混合对照品；B. 游离氨基酸供试品；C. 游离氨基酸阴性样品；D. 总肽供试品；E. 总肽阴性样品。1. 门冬氨酸；2. 谷氨酸；3. 丝氨酸；4. 组氨酸；5. 甘氨酸；6. 精氨酸；7. 苏氨酸；8. 丙氨酸；9. 脯氨酸；10. 缬氨酸；11. 赖氨酸；12. 异亮氨酸；13. 亮氨酸；14. 苯丙氨酸

图 1　康复新液中游离氨基酸和总肽的高效液相色谱图

Figure 1　HPLC chromatograms of free amino acids and total peptides in *Kangfuxin* Liquid

表 1　14 种氨基酸的回归方程、线性范围

Table 1　Regression equation and liner range of fourteen amino acids

成分	回归方程	r	线性范围/(mg·mL^{-1})
Asp	Y=1.355X+0.010	1.000 0	0.002 0 ~ 0.099 7
Glu	Y=1.488X−0.016	1.000 0	0.003 4 ~ 0.168 5
Ser	Y=1.033X−0.043	1.000 0	0.002 8 ~ 0.139 6
His	Y=1.545X−0.073	1.000 0	0.004 0 ~ 0.201 4
Gly	Y=0.770X−0.020	1.000 0	0.004 8 ~ 0.238 1
Arg	Y=2.007X−0.093	0.999 5	0.006 7 ~ 0.336 9
Thr	Y=1.674X−0.204	0.999 5	0.003 3 ~ 0.167 5
Ala	Y=0.888X−0.005	1.000 0	0.009 7 ~ 0.487 3
Pro	Y=1.144X−0.028	1.000 0	0.004 1 ~ 0.202 5
Val	Y=0.955X−0.019	1.000 0	0.004 4 ~ 0.221 6
Lys	Y=0.678X−0.002	1.000 0	0.005 4 ~ 0.270 5
Ile	Y=1.032X−0.024	1.000 0	0.003 3 ~ 0.166 8
Leu	Y=1.031X−0.008	1.000 0	0.004 8 ~ 0.240 8
Phe	Y=1.347X−0.042	1.000 0	0.004 7 ~ 0.236 6

酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸峰面积比的RSD分别为0.1%、0.1%、0.1%、0.1%、0.04%、0.02%、0.1%、0.04%、0.1%、0.03%、0.03%、0.02%、0.1%和0.02%，表明仪器精密度良好。

2.7　重复性试验

2.7.1 游离氨基酸　精密量取同一批康复新液样品(D企业，批号为B230262)0.5 mL，按“2.1.3”项下的方法平行制备6份游离氨基酸供试品溶液，按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件测定。结果门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸的平均含量分别为0.013、0.097、0.021、0.025、0.084、0.072、0.024、0.094、0.033、0.045、0.050、0.027、0.062、0.026 mg·mL^{-1}，RSD分别为0.01%、1.7%、

3.6%、3.6%、3.3%、3.2%、2.3%、1.9%、3.8%、2.7%、1.6%、3.3%、2.7%、3.8%（n=6），表明本方法重复性良好。

2.7.2 总肽　精密量取同一批康复新液样品（D企业，批号为B230262）20 mL，按“2.1.4”项下的方法平行制备6份总肽供试品溶液，按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件测定。结果门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸的平均含量分别为0.076、0.095、0.026、0.014、0.043、0.025、0.031、0.035、0.051、0.036、0.045、0.029、0.045、0.025 mg·mL^{-1}，RSD分别为2.7%、3.2%、3.9%、4.1%、3.9%、4.7%、4.0%、4.2%、3.8%、4.1%、3.1%、4.1%、4.3%、4.8%（n=6），表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收试验

2.8.1 游离氨基酸　精密量取已知游离氨基酸含量的康复新液样品（D企业，批号为B230262）0.25 mL，共6份，精密加入纯化水0.15 mL和相当于样品含量100%的混合对照品溶液0.1 mL，混匀；再精密加入内标溶液B 0.5 mL，混匀，以10 000 r·min^{-1}离心5 min（离心半径2 cm），取上清液作为游离氨基酸加样回收试验溶液。按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件测定并计算回收率。结果门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的平均回收率（n=6）分别为99.0%、108.1%、97.4%、89.3%、91.2%、86.8%、89.5%、91.5%、90.8%、93.8%、92.3%、90.4%、92.4%和91.2%；RSD分别为2.8%、3.6%、4.5%、4.3%、4.4%、4.3%、3.1%、2.8%、4.2%、3.2%、3.5%、4.5%、3.8%和3.1%（见表2），均符合方法学要求，表明本方法的准确度良好。

2.8.2 总肽　精密量取已知总肽含量的康复新液样品（D企业，批号为B230262）10 mL，共6份，分别通过已处理好的C_{18}固相萃取小柱（Waters Sep-Pak Vac，1 g），用水50 mL洗脱，弃去洗脱液；再用75%甲醇100 mL洗脱，收集洗脱液，精密加入相当于样品含量100%的混合对照品溶液1 mL，按“2.1.4”项下自“水浴蒸干……”起，制成总肽加样回收试验溶液。按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件测定并计算回收率。结果门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的平均回收率（n=6）分别为102.4%、102.7%、86.7%、90.3%、93.7%、83.2%、90.6%、97.0%、94.0%、96.1%、97.9%、93.1%、94.6%和92.0%；RSD分别为3.1%、2.1%、0.7%、0.1%、0.4%、0.6%、0.8%、0.2%、1.2%、1.0%、0.4%、0.8%、0.6%、0.4%（见表3），均符合方法学要求，表明本方法的准确度良好。

2.9 稳定性试验　分别取同一游离氨基酸供试品溶液和总肽供试品溶液（B企业，批号为23030702），按“2.2”项下的方法进行衍生化后，按“2.3”项下的色谱条件，分别于0、1.5、3、6、9、15、21、27 h注入液相色谱仪进行分析，结果游离氨基酸供试品溶液中门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸峰面积比的RSD分别为0.2%、0.5%、0.8%、0.3%、0.5%、1.2%、1.6%、0.5%、0.5%、0.3%、1.0%、0.3%、0.4%和0.6%；总肽供试品溶液中门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸峰面积比的RSD分别为0.7%、0.7%、0.8%、1.1%、0.7%、1.7%、1.8%、0.7%、0.9%、0.6%、0.6%、0.6%、0.7%和0.6%。表明游离氨基酸供试品溶液和总肽供试品溶液中各氨基酸在27 h内均稳定。

2.10 样品的测定　按拟定的方法，对4家企业135批康复新液样品，按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法制成游离氨基酸供试品溶液和总肽供试品溶液，按“2.2”项下的方法进行衍生化；再按“2.3”项下的色谱条件注入液相色谱仪，记录各成分峰面积，并按照内标法分别计算样品中游离氨基酸、总肽和总氨基酸（总氨基酸=游离氨基酸+总肽）的含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 衍生方法的选择　目前主流的柱前衍生法包括异硫氰酸苯酯（PITC）衍生、6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯（AQC）衍生、邻苯二醛（OPA）和9-芴基甲基氯甲酸（FMOC）衍生、2,4-二硝基氟苯（DNFB）衍生。其中PITC衍生产物稳定，但操作繁琐；OAP-FMOC衍生产物不稳定，衍生后应立即进

表2 康复新液中游离氨基酸的回收率试验结果

Table 2 Result of recovery test of free amino acids in *Kangfuxin* Liquid

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
Asp	0.003 3	0.005 0	0.008 1	96.00	99.0	2.8	Ala	0.023 4	0.02 44	0.045 7	91.39	91.5	2.8
			0.008 3	100.00						0.046 2	93.44		
			0.008 1	96.00						0.045 1	88.93		
			0.008 2	98.00						0.045 5	90.57		
			0.008 4	102.00						0.046 7	95.49		
			0.008 4	102.00						0.045 2	89.34		
Glu	0.024 3	0.008 4	0.033 5	109.52	108.1	3.6	Pro	0.008 1	0.010 1	0.017 9	97.03	90.8	4.2
			0.033 2	105.95						0.017 2	90.10		
			0.033 7	111.90						0.017 5	93.07		
			0.032 8	101.19						0.017 2	90.10		
			0.033 5	109.52						0.016 8	86.14		
			0.033 6	110.71						0.017 0	88.12		
Ser	0.005 2	0.007 0	0.012 5	104.29	97.4	4.5	Val	0.011 3	0.011 1	0.021 2	89.19	93.8	3.2
			0.011 9	95.71						0.022 0	96.40		
			0.012 2	100.00						0.021 8	94.59		
			0.011 6	91.43						0.021 5	91.89		
			0.012 0	97.14						0.022 1	97.30		
			0.011 9	95.71						0.021 7	93.69		
His	0.006 3	0.010 1	0.014 8	84.16	89.3	4.3	Lys	0.012 6	0.013 5	0.025 8	97.78	92.3	3.5
			0.015 2	88.12						0.025 2	93.33		
			0.015 7	93.07						0.025 0	91.85		
			0.015 0	86.14						0.025 1	92.59		
			0.015 4	90.10						0.024 8	90.37		
			0.015 8	94.06						0.024 5	88.15		
Gly	0.021 0	0.011 9	0.031 2	85.71	91.2	4.4	Ile	0.006 8	0.008 3	0.014 2	89.16	90.4	4.5
			0.032 0	92.44						0.014 5	92.77		
			0.032 2	94.12						0.013 9	85.54		
			0.031 5	88.24						0.014 4	91.57		
			0.031 7	89.92						0.014 0	86.75		
			0.032 5	96.64						0.014 8	96.39		
Arg	0.018 0	0.016 8	0.032 0	83.33	86.8	4.3	Leu	0.015 5	0.012 0	0.026 4	90.83	92.4	3.8
			0.032 7	87.50						0.026 5	91.67		
			0.031 8	82.14						0.026 8	94.17		
			0.032 5	86.31						0.025 9	86.67		
			0.033 0	89.29						0.027 1	96.67		
			0.033 5	92.26						0.026 8	94.17		
Thr	0.005 9	0.008 4	0.013 5	90.48	89.5	3.1	Phe	0.006 5	0.011 8	0.017 7	94.92	91.2	3.1
			0.013 5	90.48						0.017 2	90.68		
			0.013 2	86.90						0.017 0	88.98		
			0.013 8	94.05						0.017 4	92.37		
			0.013 2	86.90						0.016 8	87.29		
			0.013 3	88.10						0.017 5	93.22		

样分析；DNFB毒性较大，分离能力差，仅适合含氨基酸种类较少的定量分析；AQC衍生灵敏度高，衍生产物稳定，适合复杂样品分析。最终，本研究选择了AQC柱前衍生法测定康复新液中游离氨基酸和总肽的含量。

3.2 供试品溶液的前处理考察 本研究分别测定康复新液中游离氨基酸和总肽的含量。其中，游离氨基酸的含量测定方法是直接取康复新液样品进行AQC

表 3 康复新液中总肽的回收率试验结果

Table 3 Result of recovery test of total peptides in *Kangfuxin* Liquid

成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	成分	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
Asp	1.513 3	0.498 3	2.042 5	106.20	102.4	3.1	Ala	0.703 3	2.436 4	3.065 5	96.95	97.0	0.2
			2.000 8	97.83						3.061 3	96.78		
			2.035 1	104.72						3.073 8	97.30		
			2.030 2	103.73						3.064 8	96.93		
			2.010 8	99.84						3.060 7	96.76		
			2.022 7	102.23						3.072 5	97.24		
Glu	1.906 7	0.842 5	2.770 8	102.56	102.7	2.1	Pro	1.023 3	1.012 5	1.989 9	95.47	94.0	1.2
			2.752 2	100.36						1.961 8	92.69		
			2.792 8	105.18						1.973 0	93.80		
			2.771 0	102.59						1.979 2	94.41		
			2.753 0	100.45						1.962 1	92.72		
			2.792 8	105.18						1.983 2	94.80		
Ser	0.526 7	0.697 9	1.133 1	86.87	86.7	0.7	Val	0.723 3	1.108 1	1.797 5	96.94	96.1	1.0
			1.127 2	86.02						1.775 8	94.98		
			1.136 0	87.30						1.791 2	96.37		
			1.133 2	86.87						1.796 8	96.88		
			1.127 0	86.02						1.774 6	94.87		
			1.136 1	87.30						1.791 0	96.35		
His	0.270 0	1.006 8	1.180 0	90.39	90.3	0.1	Lys	0.893 3	1.352 5	2.213 0	97.57	97.9	0.4
			1.178 2	90.21						2.216 2	97.81		
			1.177 8	90.17						2.224 8	98.45		
			1.180 3	90.42						2.212 8	97.56		
			1.177 7	90.16						2.216 4	97.83		
			1.178 3	90.22						2.223 8	98.37		
Gly	0.850 0	1.190 6	1.965 4	93.68	93.7	0.4	Ile	0.586 7	0.834 0	1.369 2	93.82	93.1	0.6
			1.961 5	93.36						1.354 8	92.10		
			1.971 0	94.15						1.362 0	92.96		
			1.965 3	93.68						1.368 5	93.74		
			1.960 6	93.28						1.358 1	92.49		
			1.971 3	94.18						1.366 2	93.47		
Arg	0.496 7	1.684 5	1.899 3	83.27	83.2	0.6	Leu	0.903 3	1.203 8	2.049 2	95.19	94.6	0.6
			1.892 2	82.84						2.031 5	93.72		
			1.907 5	83.75						2.042 8	94.66		
			1.888 2	82.61						2.048 8	95.16		
			1.892 4	82.86						2.037 8	94.24		
			1.910 0	83.90						2.043 0	94.68		
Thr	0.610 0	0.837 4	1.356 8	89.18	90.6	0.8	Phe	0.500 0	1.183 2	1.590 8	92.19	92.0	0.4
			1.370 4	90.80						1.579 9	91.27		
			1.373 0	91.12						1.591 0	92.21		
			1.366 4	90.33						1.591 5	92.25		
			1.371 1	90.89						1.589 3	92.06		
			1.372 8	91.09						1.590 5	92.17		

衍生后检测；总肽的含量测定方法是首先采用C_{18}固相萃取小柱，将游离氨基酸与总肽进行分离，接着取总肽的洗脱液进行水解得到水解氨基酸，最后进行AQC衍生后检测，以水解氨基酸的总量计。在总肽的分离、富集过程中，分别对1 g和3 g两种规格的C_{18}固相萃取小柱进行了考察，结果测得总肽的含量基本一致，最终采用了规格为1 g的C_{18}固相萃取小柱。依次对水、25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇和甲

表4 康复新液中游离氨基酸、总肽和总氨基酸的含量测定结果（mg·mL^{-1}）

Table 4 Content determination results of free amino acids, total peptides and total amino acids in *Kangfuxin* Liquid(mg·mL^{-1})

生产企业	批次/批	游离氨基酸	总肽	总氨基酸
A	34	0.65～0.76	0.28～0.39	0.95～1.10
B	36	0.68～0.86	0.31～0.44	0.98～1.22
C	31	0.64～0.83	0.19～0.29	0.85～1.12
D	34	0.51～0.94	0.31～0.74	0.84～1.58

醇作为洗脱溶剂进行了考察，结果在水洗脱溶液中未检出总肽；在25%～75%甲醇洗脱溶液中均检出总肽，含量分别为0.218、0.166、0.122 mg·mL^{-1}；在甲醇洗脱溶液亦未检出总肽，说明水可将小柱上的游离氨基酸洗脱，从而与总肽进行分离，75%甲醇则可将小柱上的总肽完全洗脱，并进行富集。分别对水和75%甲醇的洗脱体积进行了考察，最终确定水的洗脱体积为50 mL，75%甲醇的洗脱体积为100 mL。

3.3 检测指标的选择 本方法可测定康复新液中的18种氨基酸的含量，但通过对135批次样品的检测，所含游离氨基酸和总肽水解氨基酸中半胱氨酸(Cys)、酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)和色氨酸(Trp)的含量均小于0.01 mg·mL^{-1}，故最终以其余14种氨基酸为检测指标测定游离氨基酸和总肽水解氨基酸的含量。

经比较，采用AQC柱前衍生HPLC法测得总氨基酸的结果与现行质量标准采用紫外分光光度法测得的结果基本一致，且前者的重现性、准确度更佳，方法更具优势。康复新液主要含有氨基酸、多肽、蛋白质、信息素、油脂及脂肪酸类。相关研究表明其中的小分子肽类具有强生物活性，如促组织修复肽、抗菌肽、抗肿瘤活性肽等，且较游离氨基酸更具有专属性[3]。本研究建立了以美洲大蠊为原料的康复新液中游离氨基酸和总肽(以水解后14种氨基酸的总量计)的含量测定方法，有助于提升对其中活性成分的质量控制水平，从而进一步保证产品的临床用药安全有效，为动物药的质量控制提供了前瞻性的检测技术和方法。

参考文献：

[1] 吕娜，沈连刚，李广志，等. 康复新液化学成分研究[J]. 中国现代中药，2017，19(4)：488-490.
[2] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局国家药品标准：WS3-B-3674-2000(Z)[S]. 2000.
[3] 李治纲，朱辉. 康复新液化学成分及药理活性研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19(94)：26-27.
[4] 张利，李志远，李惠. 高效液相色谱法测定康复新液中5种游离氨基酸的含量[J]. 医药导报，2013，32(5)：650-652.
[5] 李奇娟，张彩丽，王战国，等. 采用柱前衍生化法研究康复新液不同制备环节中氨基酸成分轮廓差异[J]. 药物分析杂志，2018，38(12)：2068-2075.
[6] 国家药典委员会. 中国药典：通则[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：295-296.

（编辑：梁进权）