

# Determination of Amino Acid Content of Collagen in Medical Macromolecules

Quan Wang, Xiaoping Wang, Junnian Zhang, Fuqin Fan, Baoku Zhang

Quanyi in Qinghai Pharmaceutical Company Limited, Haidong Qinghai  
Email: 1239892658@qq.com

Received: Oct. 20<sup>th</sup>, 2017; accepted: Nov. 6<sup>th</sup>, 2017; published: Nov. 13<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

Medical collagen macromolecular material is hydrolyzed. Phenyl isothiocyanate was used. It was separated by HPLC and tested by ultraviolet detector. According to the retention time qualitative peak area comparison is quantitative. Eighteen amino acids were detected in the medical collagen macromolecule material. The total content is 93.25%.

## Keywords

Amino Acid Content, Content Determination, Collagen, Collagen Material

# 医用大分子胶原蛋白氨基酸含量的测定

王 铨, 王晓平, 张钧年, 范芙琴, 张保库

青海全益药业有限公司, 青海 海东  
Email: 1239892658@qq.com

收稿日期: 2017年10月20日; 录用日期: 2017年11月6日; 发布日期: 2017年11月13日

## 摘 要

医用胶原蛋白大分子材料经酸水解后, 采用异硫氰酸苯酯衍生, 经反相液相色谱分离, 使用紫外检测器检测, 根据保留时间定性峰面积比较进行定量。医用胶原蛋白大分子材料中测出18种氨基酸, 总含量为93.25%。

## 关键词

氨基酸含量, 含量测定, 胶原蛋白, 胶原蛋白材料

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

胶原是细胞外基质的主要结构蛋白，是生物体内含量最高的蛋白质，它广泛存在于人体及动物体内[1]。

胶原材料采用生物技术制得，为白色海绵状固体，具有许多优异的性能，如具有充当填充物，与血小板产生血凝作用，对于各种骨折、骨肿瘤、椎管内及骨关节手术的出血，有快速止血，防止粘连，加速伤口愈合的疗效，可作为药物释放介质，可促进伤口收敛及表面细胞的爬行覆盖，可生物降解和多孔隙等，能在人体内迅速降解、吸收同时激活组织对骨形成的蛋白的活性，有利于新生骨质的形成。还可以用于组织缺失残腔、骨钉拔除空腔及骨质酥松患者骨髓腔的填充治疗，因而被广泛应用于医药卫生领域[2] [3]。1976年美国食品及药物管理局(FDA)正式批准医用胶原蛋白材料应用于临床[4]。

常用的胶原蛋白含量测定多采用成本较低、操作简单的分光光度法进行测定。利用胶原蛋白水解后产生的特异的氨基酸 L-羟脯氨酸的含量，用以明确胶原蛋白的总体水平，如(Worssner)比色法和电泳法[5]，其操作步骤繁琐，影响因素较多，样品需要量大，且准确性差。本文采用酸水解，(PITC)异硫氰酸苯酯衍生[6]，经反相高效液相色谱分离技术对医用大分子胶原蛋白氨基酸成分进行分析鉴定[7]。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料及试剂

医用胶原蛋白大分子材料(自制)；氨基酸标准溶液、异硫氰酸苯酯由 Agela 公司提供；氮气，纯度 99.999%，青海润德气体有限公司；盐酸，色谱纯，上海生化试剂厂；实验用水为去离子水。

### 2.2. 仪器及检测条件

仪器：日本岛津高效液相色谱仪、氮气吹干仪、酸度计、恒温干燥箱、分析天平；检测条件：色谱柱：Venusil XBP C18，100Å，4.6 mm × 250 mm，5 μm；梯度洗脱程序(见梯度洗脱表 1)，缓冲液配置成 pH 为 6.5 的缓冲溶液，用 0.45 μm 滤膜过滤。

**Table 1.** Gradient elution program

**表 1.** 梯度洗脱

时间	A%	B%
0.01	100	0
7.20	92	8
13.2	78	22
22.8	64	36
24.8	0	100
29.8	0	100
30.0	100	0
35.0	100	0

流速：1.0 ml/min；柱温：40℃；进样量：10 μl；检测波长：254 nm。

## 2.3. 样品水解和衍生

### 2.3.1. 氨基酸标准溶液的配制

氨基酸标准溶液采取 Agela 公司提供氨基酸方法包中的标准溶液(如图 1 所示),其中含有天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)浓度均为 2.5  $\mu\text{mol/mL}$ , 胱氨酸(Cys)为 1.25  $\mu\text{mol/mL}$ 。

### 2.3.2. 水解与衍生

准确称取一定量胶原蛋白样品 50.0 mg, 置于 10 ml 水解管中, 加入 6 mol/L 盐酸 10 ml, 密封后置 110 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  烘箱中水解 24 小时。过滤, 定容 50 ml。取 200  $\mu\text{l}$  加内标溶液 50  $\mu\text{l}$  氮吹仪吹干, 异硫氰酸苯酯衍生化后取 200  $\mu\text{l}$  加入 800  $\mu\text{l}$  去离子水, 过滤。待测液上机分析(仪器自动取样 10  $\mu\text{l}$ )。

## 3. 测定结果

取待测液上机测定, 测定出 18 种氨基酸(如图 2 所示), 标准氨基酸图谱见图 1, 待测液吸收图谱见图 2。

## 4. 计算

样品溶液中各种氨基酸浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $f_1/f_2 \times C$

其中:  $f_1$  = 样品溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

$f_2$  = 混合氨基酸标准溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

$C$  = 氨基酸对照品浓度( $\mu\text{g/ml}$ )

样品中总氨基酸含量(%) = 样品溶液中所有氨基酸浓度总和( $\mu\text{g/ml}$ )  $\times V \times 10^{-6} \times 100/W$

其中:  $V$  = 样品溶液的定容体积(ml)

$W$  = 样品质量(g)

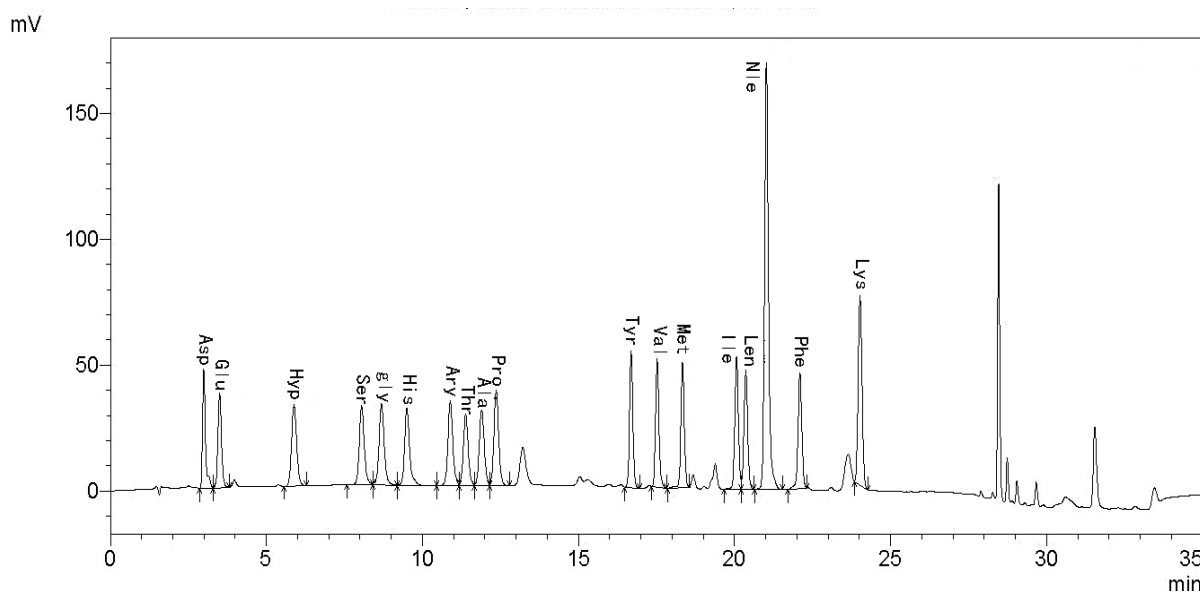


Figure 1. Standard amino acid map

图 1. 标准氨基酸图谱

## 5. 结论

医用大分子胶原蛋白材料中含有 18 种氨基酸。其中谷氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、脯氨酸含量较高(见表 2 样品中各氨基酸含量), 占氨基酸总量的 75.32%。可作为医用大分子胶原蛋白材料中全部氨基酸含量特性的代表。

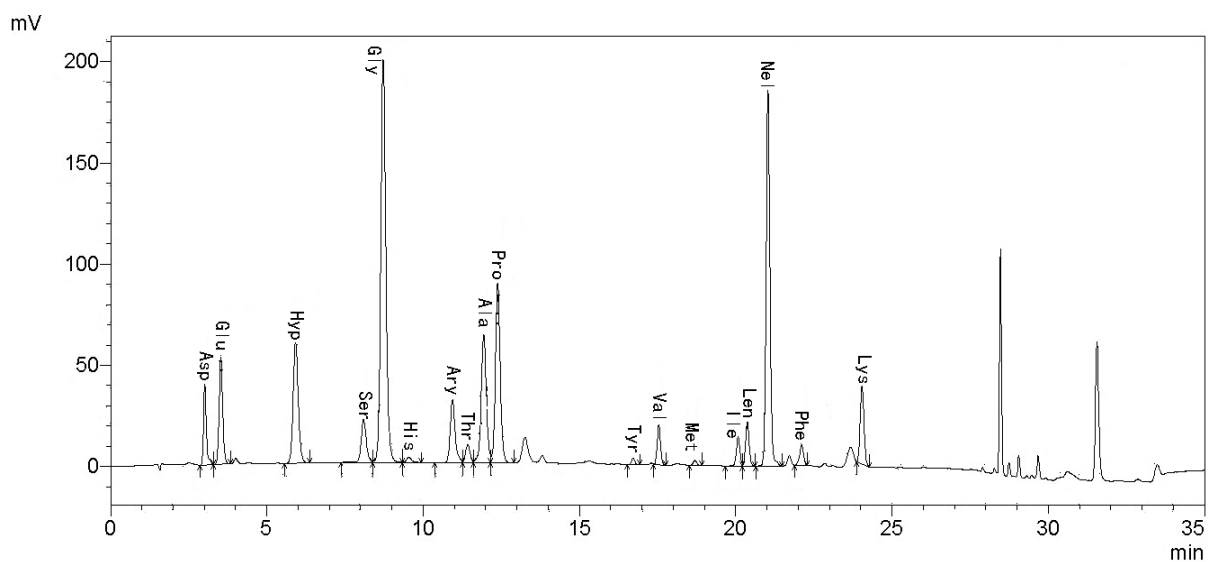


Figure 2. Sample amino acid map

图 2. 样品氨基酸图谱

Table 2. The amino acid content in the samples

表 2. 样品中各氨基酸含量

NO	各氨基酸	含量%
1	APS 天冬氨酸	4.99
2	GLU 谷氨酸	9.46
3	HYP 羟脯氨酸	11.17
4	SER 丝氨酸	3.32
5	GLY 甘氨酸	20.90
6	HIS 组氨酸	0.63
7	ARY 精氨酸	7.37
8	THR 苏氨酸	1.66
9	AIA 丙氨酸	8.84
10	PRO 脯氨酸	12.5
11	TRY 酪氨酸	0.52
12	VAL 缬氨酸	2.00
13	MET 蛋氨酸	0.35
14	ILE 异亮氨酸	1.69
15	LEN 亮氨酸	2.72
16	NLE 正亮氨酸	内标
17	PHE 苯丙氨酸	1.40
18	LYS 赖氨酸	3.73
	样品总氨基酸含量	93.25

## 6. 讨论

根据上面结果可知,使用 PITC 柱前衍生法测总氨基酸含量及其组成具有快速、灵敏;衍生方便、快速,衍生物单一、稳定, -20℃可贮存数月的优点;紫外检测(254 nm)灵敏度高;一、二级氨基酸均可检测。比较(Worssner)比色法和电泳法,具有操作步骤简便,影响因素较少,样品用量较少,且准确性高等优点。使用 PITC 柱前衍生测定氨基酸含量,扩展了此方法的应用范围,能够应用于食品、药品和生物样品中总氨基酸含量和各氨基酸含量测定的需求。

## 基金项目

青海省科学技术厅星火计划牦牛胶原蛋白医用生物肽材料生产技术研究示范项目。

## 参考文献 (References)

- [1] 邹勇,李峰,陈立柱,等. 胶原海绵的研究进展[J]. 明胶科学与技术, 2005, 25(2): 57-61.
- [2] 王永胜,候春林,陈爱民,等. 胶原海绵止血功能的试验[J]. 中国修复重建外科杂志, 2001, 15(3): 140-143.
- [3] 李贺,郑庚修,王秋芬,等. 生物医学材料胶原蛋白的研究进展[J]. 中国皮革, 2005, 34(11): 24-27.
- [4] 何兰. 牛骨胶原蛋白的提取及复合海绵的制备研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [5] 梁英丽,李艳,高孟婷,等. 西归中总氨基酸含量测定方法的研究[J]. 大理学院学报, 2009, 8(10): 9-10.
- [6] 马家驰,项勤,刘浙创,等. 异硫氰酸柱前衍生测定天东素含量[J]. 科技通报, 1900, 6(3): 152-154.
- [7] 国家质量技术监督局. GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2331-8287, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjmce@hanspub.org](mailto:hjmce@hanspub.org)