

使用氨基酸分析仪测定复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量作业指导书 (SOP)

标准号：2020 年版《中国药典》二部——复方氨基酸注射液

■ 参考标准

2020 年版《中国药典》二部——复方氨基酸注射液

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

本 SOP 参考 2020 年版《中国药典》二部——复方氨基酸注射液的相关条件和要求，采用岛津氨基酸分析仪建立了氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量测定方法。

2.2 方法使用范围

本方法适用于复方氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量的测定。

2.3 方法技术指标

本方法定量限：10 $\mu\text{mol/L}$

线性范围：10~2000 $\mu\text{mol/L}$

■ 方法原理

氨基酸经离子色谱交换柱分离，分离出的单个氨基酸组分与茚三酮试剂反应，生成紫色化合物，被检测器检测到。茚三酮作为衍生液，提高了氨基酸的灵敏度。除脯氨酸、羟脯氨酸和茚三酮反应生成黄色物质外，所有的 α -氨基酸都能与茚三酮反应生成蓝紫色物质。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津氨基酸分析系统

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP225WD；

涡旋仪：IKA MS 3 control；

移液枪：1000 μL ，200 μL ，20 μL

■ 标准品、试剂、耗材

18 种氨基酸混合标准品溶液（详细信息见附录）；

二水柠檬酸三钠、无水乙醇、硼酸、氢氧化钠、三水合乙酸钠、冰醋酸、乙二醇乙醚、茚三酮、乙醇、三氯化钛溶液、高氯酸、辛酸，分析纯及以上。

流动相 A：称量 19.6 g 的柠檬酸三钠（二水合物），在纯水约 0.8 L 中将上步称量的试剂溶解，添加乙醇 55.3 g（约 70 mL），搅拌，加入高氯酸 22.75 g，搅拌均匀，添加辛酸 0.1 mL，转移到 1 L 容量瓶中，用水定容到刻度，搅拌均匀。使用孔隙大小为 0.45 μm 的水系膜滤器进行过滤。

流动相 B：称量 58.8 g 的柠檬酸三钠（二水合物）和 12.4 g 硼酸。在纯水约 0.9 L 中将上步称量的试剂溶解。完全溶解后，添加 0.1 mL 的辛酸，搅拌。加入 5.2 g 氢氧化钠固体粉末，搅拌至完全溶解。转移到 1 L 容量瓶中，用水定容到刻度，搅拌均匀，使用孔隙大小为 0.45 μm 的水系膜滤器进行过滤。

流动相 C: 称量 4 g 氢氧化钠于流动相瓶中。在纯水约 400 mL 中将溶解, 搅拌均匀。温度降低, 恢复到室温后, 转移到 500 mL 容量瓶中, 定容到刻度, 搅拌均匀后倒入流动相瓶中。使用孔隙大小为 0.45 μm 的水系膜滤器进行过滤。

茛三酮衍生液: 称量 136 g 的三水合乙酸钠, 加入纯水 170 mL, 搅拌均匀, 加入 25 mL 乙酸, 加纯水定容到 300 mL, 加入乙二醇乙醚 660 mL, 通入 N_2 鼓泡 20 min。称量 20 g 茛三酮, 溶于 40 mL 乙醇中, 搅拌均匀。将溶解完全的茛三酮溶液倒入上述试剂瓶中。 N_2 气鼓泡 15 min 至完全溶解。加入 1.7 mL 三氯化钛溶液, N_2 鼓泡 10 min, 混合完全。使用孔隙大小为 0.45 μm 的水系膜滤器进行过滤。

无针注射器: 5 mL;

微孔过滤膜: 水系针式滤器, 0.45 μm

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

取 18 种氨基酸对照品适量, 用水稀释成 10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 、1000 $\mu\text{mol/L}$ 、2000 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的校准曲线溶液。

表 1 标准曲线的配制

标准校准溶液浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	加入的混合标液溶液浓度 (mmol/L)	加入的混合标液体积 (μL)	溶液的定容体积 (mL)
10	2.0	5	1.0
20	2.0	10	1.0
50	2.0	25	1.0
100	2.0	50	1.0
200	2.0	100	1.0
500	2.0	250	1.0
1000	2.0	500	1.0
2000	2.0	1000	1.0

6.2 仪器条件

系统控制器: CBM-20A 自动进样器: SIL-16
柱温箱: CTO-16L 输液泵: LC-16
脱气机: DGU-20A_{5R} 柱后衍生器: CRB-40
检测器: SPD-16 色谱工作站: LabSolutions Ver.5.109
色谱柱: Shim-pack Amino-Na (100 mm×6 mmI.D., 5 μm)
流动相: A: 柠檬酸三钠 - 高氯酸 - 辛酸 - 乙醇 - 水
 B: 柠檬酸三钠 - 硼酸 - 辛酸 - 氢氧化钠 - 水
 C: 氢氧化钠溶液
流速: 0.6 mL/min 柱温: 60°C
进样体积: 20 μL 洗脱方式: 梯度洗脱
衍生温度: 130°C 衍生试剂: 茛三酮溶液
衍生液流速: 0.2 mL/min
色谱柱: Shim-pack Amino-Na (100 mm×6 mmI.D., 5 μm)
流动相: A: 柠檬酸三钠 - 高氯酸 - 辛酸 - 乙醇 - 水
 B: 柠檬酸三钠 - 硼酸 - 辛酸 - 氢氧化钠 - 水
 C: 氢氧化钠溶液
流速: 0.6 mL/min 柱温: 60°C

表 2 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
9	泵	B.Conc	0
13	泵	B.Conc	7
17.2	泵	B.Conc	8
17.21	泵	B.Conc	11
20.8	泵	B.Conc	11
20.81	泵	B.Conc	50
22	泵	B.Conc	58
22.01	泵	B.Conc	100
28.8	泵	SV(Pump A)	B-A-A
29.3	泵	B.Conc	100
29.31	泵	B.Conc	0
33	泵	SV(Pump A)	A-A-A
35	泵	T.Flow	0.6
36.5	泵	T.Flow	0.7
43.3	泵	T.Flow	0.7
44	泵	T.Flow	0.6
45	控制器	Stop	

6.3 样品前处理

供试品溶液的制备：取复方氨基酸注射液样品适量，过滤，取滤液稀释后待分析。

6.4 加标试样

取复方氨基酸注射液样品进行加标，按照 6.3 步骤制备加标样品，加标浓度为 10 mmol/L。

6.5 测定

按照 5.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 20.0 μL，若检测溶液中氨基酸含量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.6 计算和报告

精密吸取供试品溶液 20 μL，注入液相色谱仪，测定峰面积，外标法计算氨基酸的含量。复方氨基酸注射液中氨基酸的含量按下式计算：

$$X = C_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{V_2}{V_1 \times 1000}$$

X — 供试品中氨基酸的含量，mmol/L；

C_s — 混合对照品溶液中被测物的浓度，μmol/L；

A — 样品溶液中被测物的色谱峰面积；

A_s — 混合对照品溶液中被测物的色谱峰面积；

V₂ — 供试品最终定容体积，mL；

V₁ — 样品体积，mL。

■ 附录

表 3 氨基酸化合物信息

No.	化合物名称	缩写	保留时间 (min)
1	门冬氨酸	Asp	6.625
2	苏氨酸	Thr	8.213
3	丝氨酸	Ser	8.842
4	谷氨酸	Glu	10.025
5	脯氨酸	Pro	11.302
6	甘氨酸	Gly	14.839
7	丙氨酸	Ala	16.336
8	半胱氨酸	Cys	17.183
9	缬氨酸	Val	18.548
10	甲硫氨酸	Met	19.627
11	异亮氨酸	Ile	21.636
12	亮氨酸	Leu	22.300
13	酪氨酸	Tyr	24.007
14	苯丙氨酸	Phe	25.213
15	组氨酸	His	26.581
16	赖氨酸	Lys	27.700
17	色氨酸	Trp	28.005
18	精氨酸	Arg	31.280

岛津应用云

