

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

LC-308

摘要：本文参考 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。实验结果显示：对照品溶液重复进样 6 次，18 种氨基酸色谱峰保留时间和峰面积的 RSD 在 0.01%-0.14% 和 0.24%-2.54% 之间，仪器精密度良好；以外标法定量，在 10-2000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内，18 种氨基酸线性相关系数均大于 0.999，准确度在 82.7-107.0% 之间；对氨基酸注射液样品进行加标回收实验，回收率在 96.2-106.4% 之间。本方法准确度高，重复性好，适合氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量的快速测定。

关键词：氨基酸分析 柱后衍生 含量测定

氨基酸高效液相色谱分析方法有柱前衍生和柱后衍生两种方法，本研究参考 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，采用岛津茚三酮柱后衍生氨基酸分析系统建立了氨基酸注

射液中 18 种氨基酸含量测定方法。该系统稳定性好，重复性高，适合氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量的快速测定，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

系统控制器：CBM-20A

柱温箱：CTO-16L

脱气机：DGU-20A_{5R}

检测器：SPD-16

自动进样器：SIL-16

输液泵：LC-16

柱后衍生器：CRB-40

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.109

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Na (100 mm × 6 mm I.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

进样体积：20 μL

衍生温度：130°C

衍生液流速：0.2 mL/min

柱温：60°C

洗脱方式：梯度洗脱

衍生试剂：茚三酮溶液

表 1 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	

■ 样品前处理

对照品溶液的制备: 取 18 种氨基酸对照品适量, 用水稀释成 10 μmol/L、20 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、500 μmol/L、1000 μmol/L、2000 μmol/L 不同浓度的校准曲线溶液。

供试品溶液的制备: 取氨基酸注射液样品适量, 过滤, 取滤液稀释后待分析, 记为 UNK。

■ 结果与讨论

3.1 对照品及溶剂空白色谱图

按照 1.2 中分析条件对 2 中对照品溶液进行测定, 色谱图如图 1 所示。

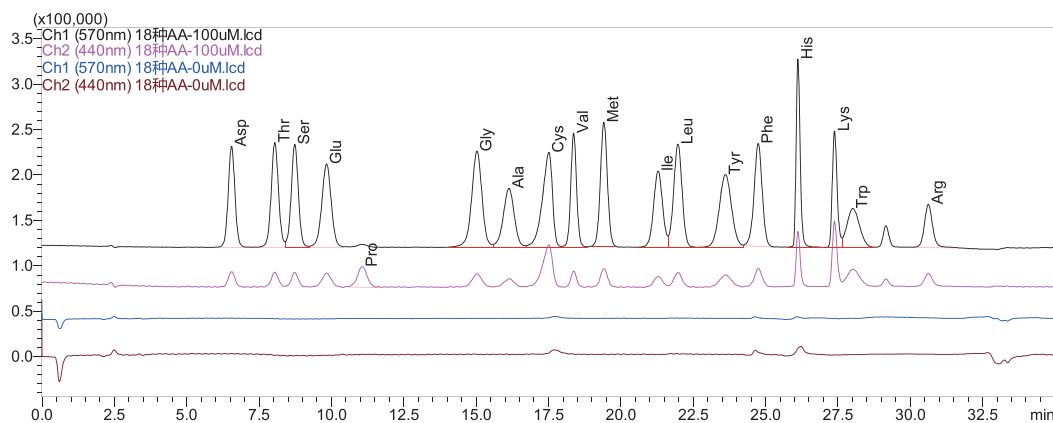


图 1 对照品溶液 (100 μmol/L) 及溶剂空白色谱图

3.2 线性

将对照品溶液按照 1.2 分析条件进行测定, 以 18 种氨基酸的浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归分析, 18 种氨基酸的线性范围为 10-2000 μmol/L, 相关系数均大于 0.999, 准确度在 82.7-107.0% 之间, 线性良好, 线性方程等相关参数见表 2。

表 2 18 种氨基酸校准曲线参数

序号	测定化合物	线性范围 (μmol/L)	校准曲线	准确度 (%)	相关系数 r
1	Asp	10-2000	Y = 17022.1X + 27298.1	87.8-105.2	0.9995
2	Thr	10-2000	Y = 19153.9X + 31996.3	88.3-105.4	0.9995
3	Ser	10-2000	Y = 18184.9X + 33962.6	85.0-106.7	0.9992
4	Glu	10-2000	Y = 19997.0X + 20433.0	92.9-105.0	0.9997

5	Pro	10-2000	$Y = 5031.31X + 42213.1$	87.1-102.5	0.9997
6	Gly	10-2000	$Y = 24628.9X + 44248.9$	82.7-103.3	0.9993
7	Ala	10-2000	$Y = 16043.1X + 25908.5$	86.5-103.7	0.9992
8	Cys	10-2000	$Y = 23766.0X + 38875.5$	85.0-106.7	0.9990
9	Val	10-2000	$Y = 16440.7X + 35558.1$	84.2-106.9	0.9990
10	Met	10-2000	$Y = 22136.5X + 34638.5$	87.8-106.6	0.9992
11	Ile	10-2000	$Y = 17785.5X + 12395.3$	96.1-103.0	0.9997
12	Leu	10-2000	$Y = 21804.1X + 41760.9$	87.3-105.8	0.9993
13	Tyr	10-2000	$Y = 22425.7X + 31389.1$	88.1-105.2	0.9995
14	Phe	10-2000	$Y = 21239.9X + 34374.1$	85.0-107.0	0.9991
15	His	10-2000	$Y = 19402.3X + 7352.83$	93.0-104.7	0.9995
16	Lys	10-2000	$Y = 15189.2X + 1193.42$	97.6-104.0	0.9996
17	Trp	10-2000	$Y = 12696.5X + 28716.8$	96.9-102.5	0.9999
18	Arg	10-2000	$Y = 9238.64X + 6377.29$	94.5-106.2	0.9996

3.3 精密度试验

按照 1.2 分析条件，分别取 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 对照品溶液上机测试，并计算各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD），以评价系统的检测结果的重复性，表 3 结果显示，目标物保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.01%-0.14% 和 0.24%-2.54% 之间。精密度实验结果表明，氨基酸分析系统具有良好的精密度。

表 3 精密度试验结果 (n=6)

序号	待测化合物	RSD% (10 $\mu\text{mol/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{mol/L}$)	
		保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	Asp	0.14	2.54	0.06	0.40
2	Thr	0.06	1.83	0.04	0.37
3	Ser	0.05	2.51	0.03	0.55
4	Glu	0.07	1.98	0.03	1.59
5	Pro	0.12	2.29	0.03	1.57
6	Gly	0.02	1.53	0.02	0.25
7	Ala	0.05	1.88	0.02	0.39
8	Cys	0.07	1.98	0.07	0.40
9	Val	0.04	0.97	0.03	0.24
10	Met	0.04	0.70	0.03	0.85
11	Ile	0.05	2.39	0.06	0.41
12	Leu	0.03	1.02	0.02	0.46
13	Tyr	0.09	1.74	0.01	0.46
14	Phe	0.02	1.89	0.01	0.62
15	His	0.01	1.63	0.01	0.68
16	Lys	0.01	0.86	0.01	0.39
17	Trp	0.02	2.35	0.02	1.31
18	Arg	0.01	2.17	0.01	1.88

3.4 样品测定

对供试品溶液稀释 100 倍后进样测定，供试品溶液色谱图如图 2 所示。以外标法计算供试品含量，定量结果如表 4 所示。

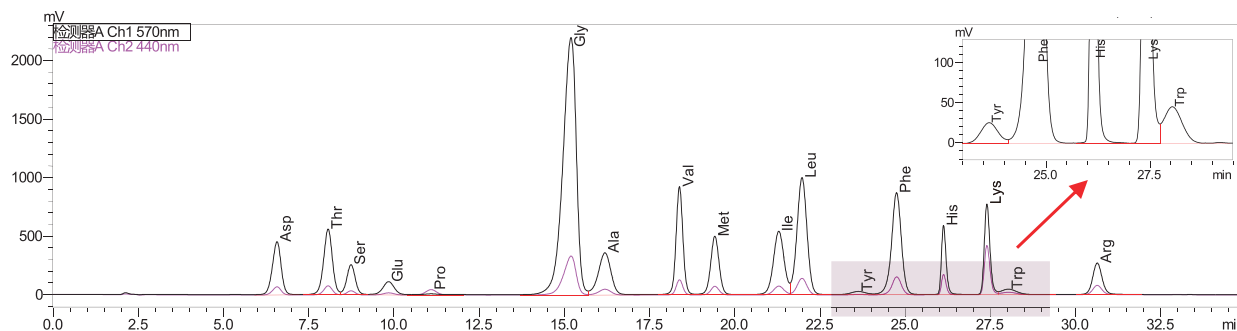


图 2 供试品溶液色谱图

3.5 回收率试验

在供试品中添加 18 种氨基酸标准溶液，加标浓度为 10 mmol/L，稀释 100 倍后进行测定。经测试 18 种氨基酸的回收率在 96.2-106.4% 之间，加标回收率如表 4 所示。

表 4 供试品溶液测试结果

序号	待测化合物	测试结果 (mmol/L)	加标回收率 (%)
1	Asp	18.89	104.8
2	Thr	21.09	103.9
3	Ser	9.72	98.8
4	Glu	5.07	96.5
5	Pro	8.10	97.4
6	Gly	97.72	102.6
7	Ala	22.78	103.3
8	Cys	N.D.	106.4
9	Val	31.38	101.5
10	Met	15.42	104.2
11	Ile	26.65	102.9
12	Leu	37.67	98.5
13	Tyr	1.33	105.3
14	Phe	32.83	99.2
15	His	11.74	96.2
16	Lys	23.68	103.4
17	Trp	4.28	101.8
18	Arg	22.69	104.1

注：N.D. 表示未检出。

■ 结论

本文参考 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系统建立了氨基酸注射液中 18 种氨基酸含量测定方法。结果显示线性、精密度及加标回收率试验结果均满足相关测定要求，本方法可用于氨基酸含量测定，供相关检测人员参考。

岛津应用云

