

气相色谱质谱联用法检测氨基酸注射液中苏氨酸

GCMS-065

摘要：本实验建立了对氨基酸注射液中苏氨酸含量的气相色谱质谱联用检测方法。实验以水为溶剂，通过在60℃常压彻底蒸去水分后，使用99:1的双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)和三甲基氯硅烷(TMCS)为衍生化试剂，在吡啶存在的条件下进行衍生。结果显示在选择离子模式下目标组分无干扰，加标回收率为141%，线性范围为0.5-100 µg/mL，1 µg/mL浓度苏氨酸衍生物峰面积的RSD为5.7%，方法检测限为0.0067 µg/mL。该方法可用于氨基酸注射液中苏氨酸含量的简单、定量检测。

关键词：气相色谱质谱联用 苏氨酸 氨基酸

氨基酸是指一类含有羧基并在与羧基相连的碳原子上连有氨基的有机化合物。是构成动物营养所需蛋白质的基本物质。人体所需的氨基酸约有22种，分非必需氨基酸和必需氨基酸(须从食物中供给)。

氨基酸的重要性，及特殊结构，使氨基酸分析是成为色谱领域的一大课题。大多数氨基酸中不含紫外或荧光基团，而且其分子为内盐，熔点很高，受强热分解，因此，无论是传统的液相色谱法或气相色谱法分析氨基酸都需要进行衍生化。

苏氨酸是一种重要的营养强化剂，可以强化谷物、糕点、乳制品，和色氨酸一样有恢复人体疲劳，促进生长发育的效果。医药上，由于苏氨酸的结构中含有羟基，对人体皮肤具有持水作用，与寡糖链结合，对保护膜起重要作用，在体内能促进磷脂合成和脂肪酸氧化。其制剂具有促进人体发育抗脂肪肝药用效能，是复合氨基酸输液中的一个成分。同时，苏氨酸又是制造一类高效低过敏的抗生素——单酰胺菌素的原料。

苏氨酸分子中除了-COOH，-NH₂官能团以外，还含有-OH，它与酰化试剂反应比-NH₂难，常生成几种产物，严重影响苏氨酸的定量。苏氨酸(threonine, Thr)中醇羟基的存在，使氨基酸GC分析时通常采用的先酯化，再三氟乙酰化的衍生化方法不再适合。同样，苏氨酸在和反相HPLC分析中常用的DABS-Cl等磺酰氯类氨基酸衍生试剂定量反应时也遇到困难。本文采用BSTFA

作为衍生化试剂，将苏氨酸一步衍生成N,O,O-三(三甲基硅烷基)苏氨酸(Thr-3TMS)，再以气质联法定量测定氨基酸注射液中的苏氨酸含量，对苏氨酸的硅烷化衍生-气相色谱质谱联用的分析条件进行了有益的方法研究。

实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津GCMS-QP2010 Plus气质联用仪、恒温鼓风干燥箱。

吡啶为HPLC级，衍生试剂：双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)-三甲基氯硅烷(TMCS)(体积比99:1)。

1.2 分析条件

色谱柱：DB-5MS(30 m×0.25 mm i.d.×0.25 mm)

进样口温度：250℃

柱温：60℃(1 min) 15℃/min 250℃(3 min)

柱流量：1.03 mL/min

进样模式：分流，分流比30:1

离子源温度：230℃

接口温度：250℃

采集方式：SIM(定量离子和参考离子见表1)

表1 苏氨酸衍生物定量离子和参考离子

氨基酸	定量离子	参考离子
苏氨酸	291	73, 117, 219

1.3 样品处理

样品处理步骤见图1。

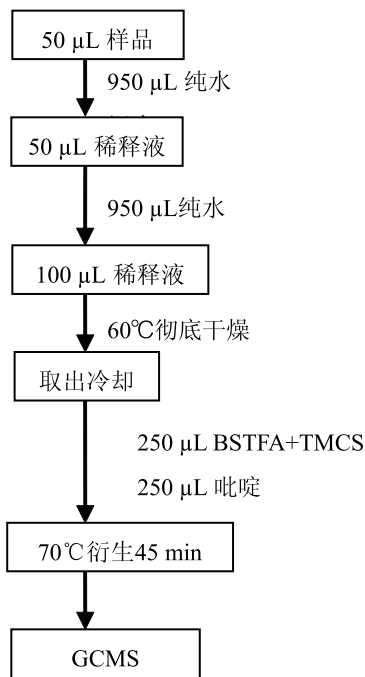


图1 样品前处理步骤

结果与讨论

2.1 苏氨酸出峰谱图

图2为本方法检测苏氨酸标样的总离子流图(浓度为100 μg/mL)

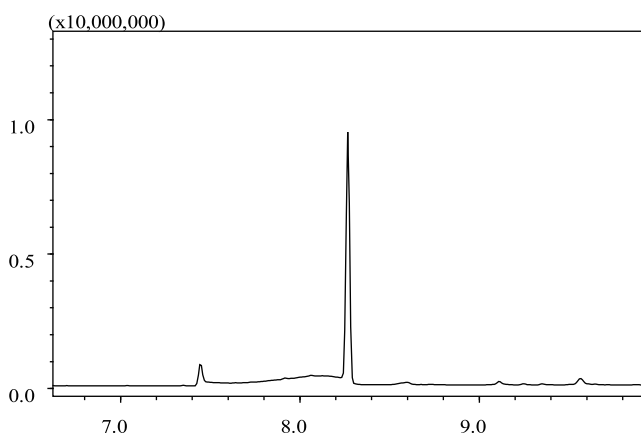


图2 苏氨酸标样总离子流图

图3为苏氨酸标样的提取离子色谱图(浓度为0.5 μg/mL m/z为291)

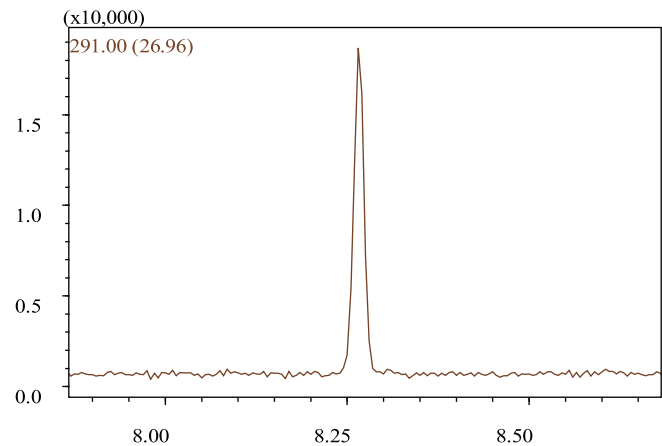


图3 苏氨酸标样提取离子色谱图

2.2 标准曲线

用纯水溶解适量苏氨酸，定容得浓度为50 mg/mL的工作液贮备液，将此贮备液逐级稀释成① 5 mg/mL，② 0.25 mg/mL，③ 0.0125 mg/mL的系列标准工作溶液。依次吸取20 μL ③，40 μL ③，20 μL ②，40 μL ②，100 μL ②，200 μL ②标准工作溶液于6个样品瓶中，在60°C下恒温蒸干水分后衍生，分别进样1 μL，得到校准曲线，如图3所示。衍生物对应的苏氨酸标准品的浓度分别为0.5, 1, 10, 20, 50, 100 μg/mL。以衍生物峰面积对苏氨酸标准品的浓度作图，得到如下图所示的校准曲线。

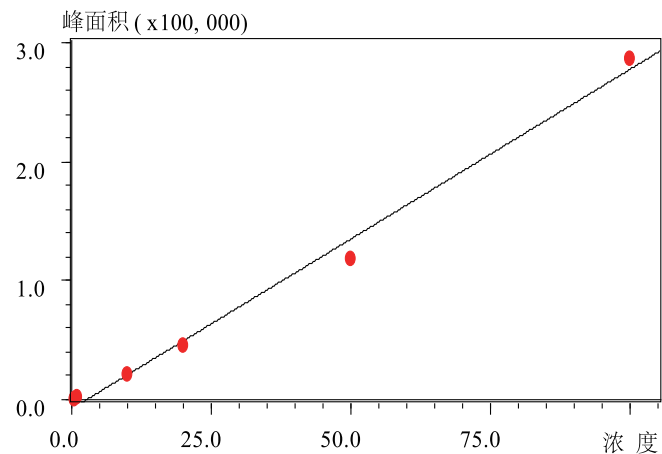


图4 苏氨酸校准曲线

结果表明，该方法线性较好，线性方程及相关系数见表2。

表2 线性方程及相关系数

氨基酸	线性方程	相关系数
苏氨酸	$Y=2858X-7536$	0.9963

2.3 方法重现性

平行测定浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的标液，连续7针进样的重现性结果如表3所示。

表3 保留时间与峰面积的重现性

编号	保留时间(min)	峰面积
1	8.270	1478
2	8.275	1334
3	8.270	1304
4	8.275	1258
5	8.275	1338
6	8.270	1265
7	8.270	1387
平均值	8.272	1338
RSD%	0.03	5.7

结果表明，本方法在校准曲线的低浓度点，其测试结果仍然具有良好的重现性。

2.4 加标回收率

取三份空白样品(以实验室自来水代替)，各加入相同浓度的苏氨酸标准工作液，使衍生后苏氨酸最终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 。加标回收率结果如表4所示。

表4 加标回收率

加标量($\mu\text{g/mL}$)	化合物	平均结果($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率(%)
1	苏氨酸	1.41	141

2.5 检测限

以三倍噪声计算得出苏氨酸的检测限为0.0067 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 实际样品分析结果

按本方法测定市售的某品牌氨基酸注射液，得到的图谱如图5所示(SIM采集方式，定量离子 m/z 291)。经过换算后，原注射液样品中苏氨酸的浓度为7491.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

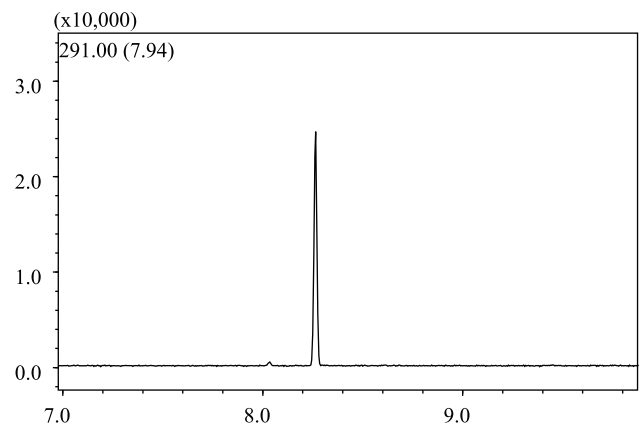


图5 某品牌注射液样品提取离子流图

结论

本方法具有灵敏度高、重现性好、线性范围宽等优点，可用于氨基酸注射液中苏氨酸含量的定量测定。