

LC-30A 柱前衍生超快速分析氨基酸注射液（异硫氰酸苯酯法）

LC-079

摘要：本文使用岛津 LC-30A 液相色谱仪建立了柱前衍生法检测注射液中的氨基酸方法。以异硫氰酸苯酯为柱前衍生剂，使用 C18 柱，10 mM 磷酸缓冲液（pH=6.9）和乙腈为流动相，紫外检测器检测波长 245 nm。五点外标法绘制工作曲线，各氨基酸标准曲线的线性相关系数在 0.9982 至 1.0000 之间，保留时间的 RSD% 在 0.03%–1.38% 之间，峰面积的 RSD% 在 0.22%–1.18% 之间，结果的重复性良好。17 种氨基酸分离度良好，2.0 μmol/mL 标准溶液的 17 种氨基酸的分离度在 1.3 以上。此法可以同时检测 17 种游离氨基酸。

关键词：柱前衍生法氨基酸快速分析

氨基酸是构成蛋白质的基本单元。氨基酸分为必需氨基酸和非必需氨基酸，必需氨基酸是指人体不能合成或合成速度远不适应机体的需要，必须由食物蛋白供给的氨基酸，共有八种。17 种氨基酸中仅有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸在近紫外区（200–300nm）有吸收，其余均在远紫外区（200 nm 以下）。为了提高氨基酸检测的灵敏度，本文使用异硫氰酸苯酯作为柱前衍生试剂，衍生反应见图 1。17 种氨基酸在 245 nm 下同时检测，总的分析时间为 8 分钟。

本实验中建立了一种快捷的氨基酸检测方法，并应用于氨基酸注射液样品的分析。

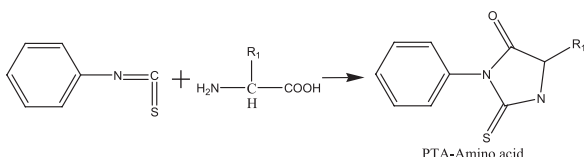


图 1 异硫氰酸苯酯衍生反应

实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂：乙腈、甲醇，HPLC 级；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、异硫氰酸苯酯乙腈溶液、三乙胺、正己烷、HCl；2.0 μmol/mL 氨基酸标准品。

仪器：LC-30A

1.2 色谱条件

色谱柱：Shimpack XR-ODS III column (1.6 μm, 2.0 × 75 mm)；

流动相：A：10 mM 磷酸缓冲液（pH=6.9）；

B：乙腈；流速：0.6 mL/min；

洗脱方式：梯度洗脱（梯度见表 1）；

柱温：40℃；检测波长：245 nm，进样量：0.4 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Value
0	3
0.5	3
2	20
3	20
5	35
5.01	3
8	Stop

样品配制

2.1 氨基酸标准溶液的配制

使用 0.1 N 的 HCl 作为稀释液，将 2.0 μmol/mL 氨基酸标液逐级稀释成 0.01、0.1、0.5 和 1.0 μmol/mL 四个工作溶液。选择 0.01、0.1、0.5、1.0 和 2.0 μmol/mL 五份标样分别按照报告分析条件中所述的衍生条件进行柱前衍生，衍生完成后进样分析。

2.2 氨基酸注射液样品的处理

使用 0.1 N 的 HCl 作为稀释液，将氨基酸注射液样品稀释 20 倍后，取 8 份待测样按照报告分析条件中所述的衍生条件分别进行 8 次柱前衍生化反应，衍生完成后分别进样分析。

2.3 异硫氰酸苯酯衍生方法

200 μL 样品中加入 100 mM 异硫氰酸苯酯（乙腈溶液）100 μL 和 1 M 三乙胺（乙腈溶液）100 μL，室温下放置 1 小时。向反应液中加入 400 μL 正己烷，振荡。静置分层后取下层液，经一次性针式滤器过滤（0.45 μm）过滤后进样分析。

结果与讨论

3.1 氨基酸标准样品的标准曲线结果

图 2 是浓度为 2 μmol/L 的氨基酸衍生后的色谱图，

图 3 是五个不同浓度的氨基酸标准溶液衍生后采集得到的色谱图。标样的柱效数据见表 2。各氨基酸的校准曲线及方程如下所示。各组分的标准曲线线性关系良好，17 种氨基酸标准曲线的线性相关系数在 0.9982 以上。

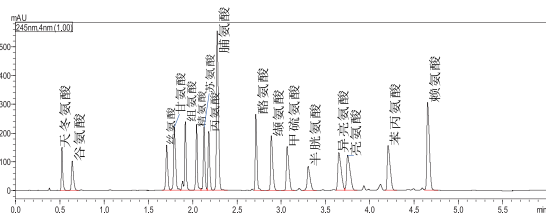


图 2 氨基酸标准样品的色谱图

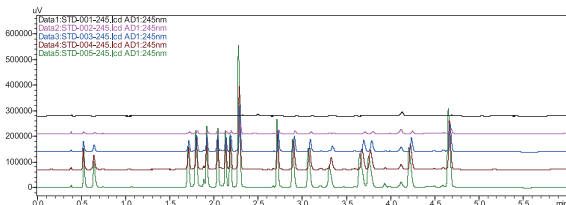
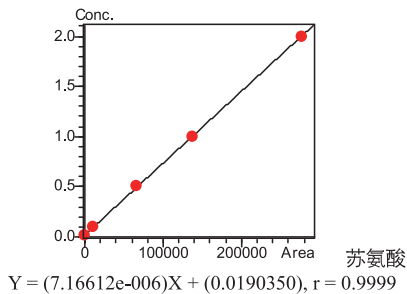
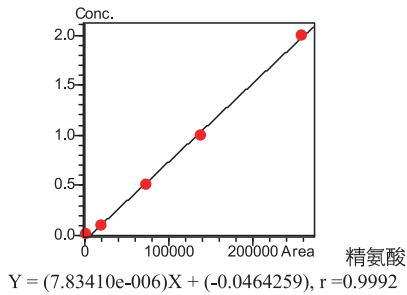
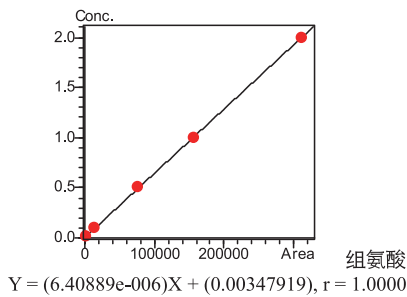
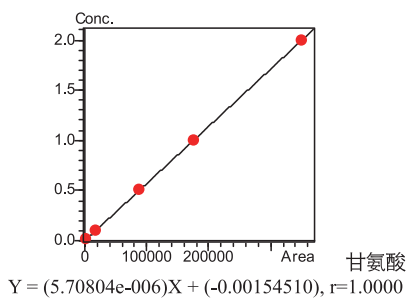
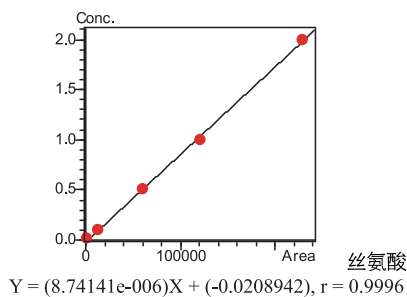
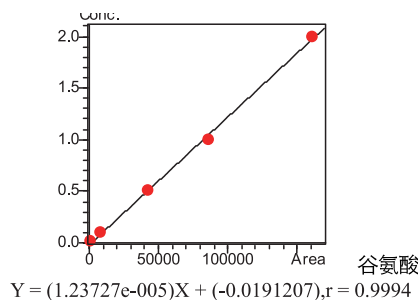
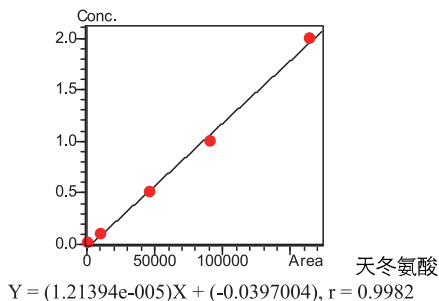
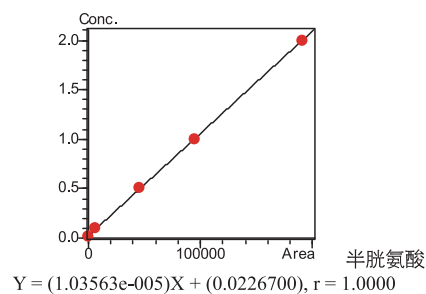
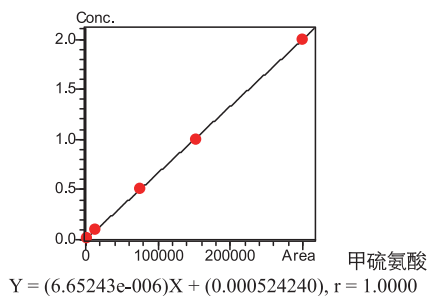
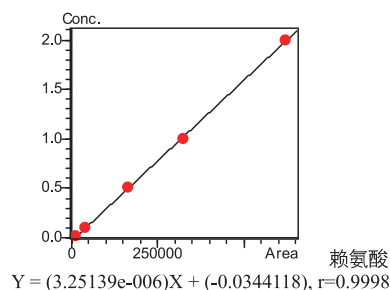
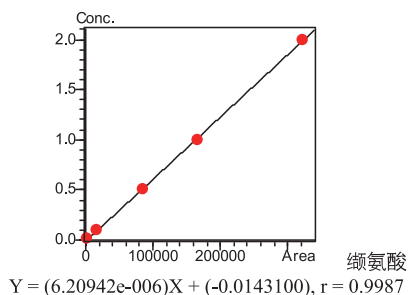
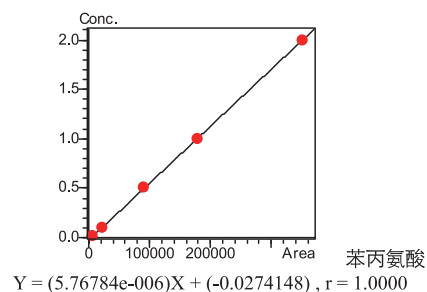
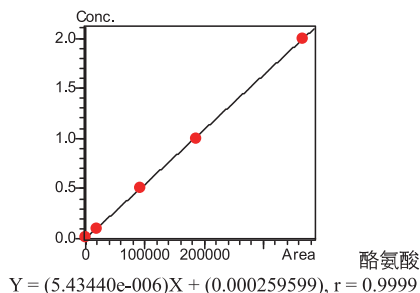
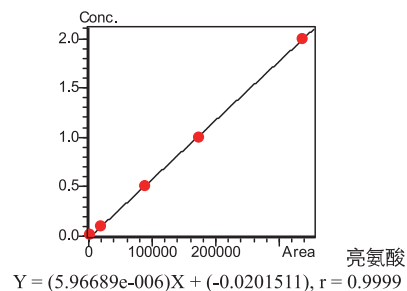
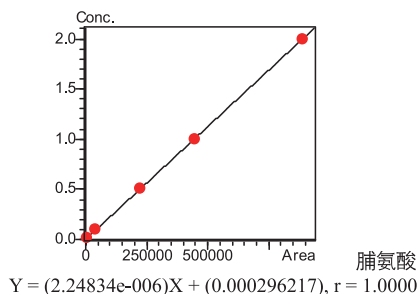
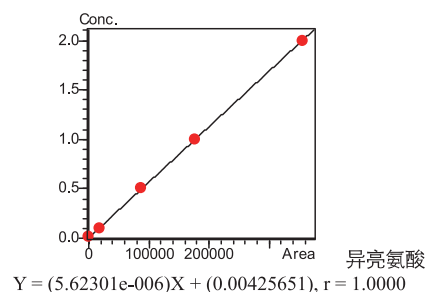
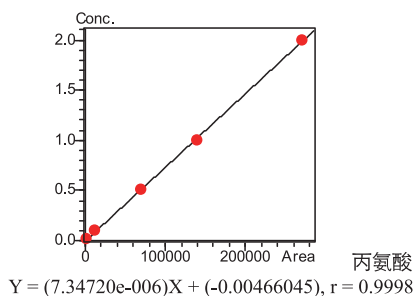


图 3 五个不同浓度的氨基酸标准样品的色谱图

表 2 氨基酸标准样品的柱效数据 (2 μmol/L)

ID	名称	保留时间 (min)	理论塔板数	分离度
1	Asp	0.52	5248	--
2	Glu	0.64	3764	3.28
3	Ser	1.70	31391	26.57
4	Gly	1.79	28850	2.14
5	His	1.91	69772	3.49
6	Arg	2.04	84476	4.44
7	Thr	2.12	65537	2.73
8	Ala	2.18	59917	1.55
9	Pro	2.27	41389	2.34
10	Tyr	2.71	86965	10.71
11	Val	2.88	62305	4.21
12	Met	3.06	49209	3.51
13	Cys	3.30	47397	4.10
14	Ile	3.65	37694	5.08
15	Leu	3.75	37013	1.30
16	Phe	4.20	70487	6.46
17	Lys	4.65	110599	7.47





3.2 方法的重复性和灵敏度

为了进一步考察该方法的重复性, 本文对 2 μmol/L 氨基酸标准溶液进行了 7 次衍生, 分别进样分析, 重复性结果 (RSD% 表示) 汇总在表 3 中。保留时间的 RSD% 在 0.03%–1.38% 之间, 峰面积的 RSD% 在 0.22%–1.18% 之间, 结果的重复性良好。

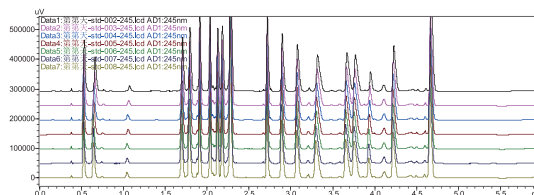


图 4 氨基酸标准溶液的 7 次重复分析结果

表 3 氨基酸标准溶液的重复性考察 (n=7)

Peak#	AA	保留时间(min)		峰面积	
		Average	RSD%	Average	RSD%
1	Asp	0.52	0.91	215159	0.48
2	Glu	0.64	1.38	195460	0.22
3	Ser	1.69	0.25	283295	0.39
4	Gly	1.78	0.23	346133	0.33
5	His	1.91	0.10	332304	0.39
6	Arg	2.03	0.03	320564	0.49
7	Thr	2.12	0.13	277768	0.55
8	Ala	2.17	0.13	305875	0.39
9	Pro	2.27	0.11	789782	0.34
10	Tyr	2.71	0.09	366754	0.36
11	Val	2.89	0.11	347952	0.33
12	Met	3.07	0.12	326840	0.33
13	Cys	3.30	0.23	351236	0.45
14	Ile	3.66	0.17	349379	0.30
15	Leu	3.75	0.16	347109	0.69
16	Phe	4.22	0.11	342319	1.18
17	Lys	4.66	0.12	650083	1.04

8	Ala	2.19	0.17	145335	1.24
9	Pro	2.30	0.15	79246	0.87
10	Tyr	2.73	0.14	17483	1.08
11	Val	2.90	0.15	217524	0.84
12	Met	3.09	0.17	107283	0.78
13	Cys	3.35	0.18	3838	6.07
14	Ile	3.67	0.18	201219	0.51
15	Leu	3.76	0.16	277977	0.64
16	Phe	4.22	0.12	248643	2.48
17	Lys	4.66	0.10	342989	1.82

氨基酸注射液的检测结果如表 5 所示。氨基酸注射液中的氨基酸含量从 0.76 到 89.6 $\mu\text{mol/mL}$ 之间。氨基酸注射液进样前用 0.1 N 盐酸稀释 20 倍，进样浓度乘以稀释倍数为注射液中氨基酸的浓度。

表 5 氨基酸注射液样品的检测结果 (n=10)

ID	AA	进样浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)	注射液浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)
1	Asp	0.90	17.9
2	Glu	0.26	5.10
3	Ser	0.45	9.00
4	Gly	4.48	89.6
5	His	0.49	9.80
6	Arg	1.15	22.9
7	Thr	0.87	17.3
8	Ala	1.06	21.3
9	Pro	0.18	3.40
10	Tyr	0.10	1.90
11	Val	1.34	26.7
12	Met	0.71	14.3
13	Cys	0.04	0.76
14	Ile	1.14	22.8
15	Leu	1.66	33.2
16	Phe	1.43	28.6
17	Lys	1.08	21.7

3.3 注射液样品的分析结果

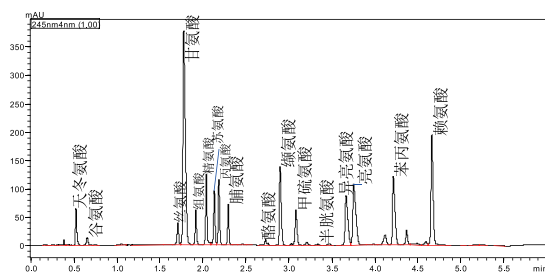


图 5 注射液样品中氨基酸分析的色谱图

氨基酸注射液谱图见图 5，为了进一步考察衍生方法的稳定性，同一份样品每隔一小时进样一次，十次重复测量的结果 (RSD% 表示) 汇总在表 4 中。保留时间的 RSD% 在 0.09%–0.60% 之间，峰面积的 RSD% 在 0.51%–6.07% 之间，半胱氨酸由于含量低导致峰面积 RSD 值较高。

表 4 氨基酸注射液样品的稳定性考察 (n=10)

ID	AA	保留时间(min)		峰面积	
		Average	RSD%	Average	RSD%
1	Asp	0.53	0.38	77030	2.11
2	Glu	0.66	0.60	22143	2.17
3	Ser	1.71	0.21	53576	1.36
4	Gly	1.78	0.19	765321	0.64
5	His	1.92	0.14	75987	1.33
6	Arg	2.04	0.09	152332	1.36
7	Thr	2.14	0.17	118429	1.55

讨论

本报告中使用了 LC-30A 超快速液相色谱仪，异硫氰酸苯酯柱前衍生法同时检测了 17 种氨基酸的混合标准溶液，并成功地应用于氨基酸注射液含量的分析。本法具有快速便捷稳定的优点，可广泛用于医药、食品等样品中氨基酸含量分析。