

· 论 著 ·

用 HPLC 法和氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中 18 种氨基酸

万丹晶¹, 陈妙芬², 翟咏虹³

(1. 复旦大学药学院放射药理学教研组, 上海 200032; 2. 上海市药品检验所, 上海 200233; 3. 上海健特生物科技有限公司, 上海 200023)

[摘要] **目的:** RP-HPLC 法和氨基酸分析仪 (amino acid analyzer, AAA) 法测定氨基酸含量的比较。**方法:** 采用 Agilent 高效液相色谱系统和日立 835-50 氨基酸分析仪测定多维氨基酸片中 18 种氨基酸的含量。RP-HPLC 法采用 C₁₈ 柱和邻苯二甲醛柱前衍生化进行, AAA 法采用离子交换色谱柱和茚三酮柱后衍生化进行。**结果:** HPLC 法和 AAA 法的变异系数分别 < 1.5% 和 3%, 最小检测量分别为 3 pmol 和 30 pmol。HPLC 法的测定值与 AAA 的测定值有相关性。两种测定方法的平均相对偏差为 5.74% (0.24% ~ 9.60%)。**结论:** 两种方法都可用于测定氨基酸, 但测定结果存在差异。

[关键词] 氨基酸类; 色谱法, 高压液相; 氨基酸分析仪

[中图分类号] R 927.2; R 977.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-2838(2006)03-0212-03

Determination of 18 kinds of amino acids in multi-amino-acid tablets by RP-HPLC method and amino acid analyzer

WAN Dan-Jing¹, CHEN Miao-Fen², ZHAI Yong-Hong³ (1. Department of Radiopharmacy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai 200233, China; 3. Shanghai Giant Biotech Co. Ltd, Shanghai 200023, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the methods of RP-HPLC and amino acid analyzer (AAA) for determining concentrations of amino acids. **Methods:** Eighteen kinds of amino acids in multi-amino-acid tablets were measured by an Agilent HPLC and Hitachi 835-50 amino acid analyzer. One C₁₈ column was used for HPLC method with *o*-phthalaldehyde precolumn derivatation. An ion exchange chromatography column was used for AAA method with ninhydrin postcolumn derivatation. **Results:** The coefficients of variation of HPLC and AAA methods were less than 1.5% and 3.0%, respectively. The minimal detectable limit was 3 pmol for HPLC method and 30 pmol for AAA method. The results obtained from RP-HPLC were correlated to those of AAA method. The average relative standard deviation of the two methods was 5.74% (ranged from 0.24% to 9.60%). **Conclusion:** Both methods can be used to determine the concentrations of amino acids, but there is difference between the results of the two methods.

[KEY WORDS] amino acids; chromatography, high pressure liquid; amino acid analyzer

[Pharm Care & Res, 2006, 6(3): 212-214]

氨基酸的测定方法^[1]很多,经典的氨基酸分析方法是采用柱后衍生、用茚三酮作为衍生试剂的离子交换色谱法。此法需专门的仪器,分析时间较长。随着 HPLC 技术的发展,用反相柱(C₈、C₁₈)柱前衍生化法测定氨基酸取得了很大发展^[2]。该法无需特殊反应装置,具有高效、简便、快速和价格低廉的优点。常见方法是采用邻苯二甲醛(OPA)和 2-巯基乙醇与氨基酸反应进行柱前衍生,衍生物用 RP-HPLC 法梯度洗脱,检测器可为荧光或紫外检测器。但采用不同方法同时测定某个氨基酸产品,并对测定结果的相关性进行比较的文章很少^[3]。本研究采用 RP-HPLC 法和氨基酸分析仪(amino acid analyzer, AAA)法测定多维氨基酸片中 18 种氨基酸含量,并对两种方法的测定结果进行比较,以了解这两种检测法测定结果之间的相关性。

1 仪器和试剂

1.1 药品 18 种氨基酸对照品[亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、色氨酸(Trp)、蛋氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、牛黄酸(Tau)、酪氨酸(Tyr)、天冬氨酸(Asp)]购自 Sigma 公司,多维氨基酸片(批号 20041025)由上海健特生物科技有限公司提供;邻苯二甲醛、9-苄基氯甲酸甲酯(FMOC)、2-巯基乙醇和茚三酮购自 Fluka 公司;HCl (0.1 mol/L 和 6 mol/L);

[作者简介] 万丹晶(1968-),女(汉族),硕士,讲师。
E-mail: wandanjing@sina.com

其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱系统, 包括四元泵、脱气机、自动进样器、紫外检测器、柱温箱, HP 化学工作站。日立 835-50 氨基酸分析仪, HW-2000 氨基酸分析专用色谱工作站。SJ-4 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂)。层析柱: 离子交换树脂 2619 (2.6 mm×180 mm, 日立株式会社)。

2 方法和结果

2.1 氨基酸对照品贮备液的制备 精密称取 18 种氨基酸适量, 用 0.1 mol/L 的 HCl 制成含每种氨基酸浓度为 0.5 μmol/mL 的混合氨基酸贮备液, 置 -4℃ 冰箱中保存。

2.2 RP-HPLC 衍生化试液的制备 精密称取邻苯二甲醛 80 mg, 加 0.4 mol/L (用 40% 的氢氧化钠调 pH 为 10.2) 硼酸缓冲液 7 mL 溶解, 乙腈 1 mL, 2-巯基乙醇 125 μL, 摇匀配成 1% 的邻苯二甲醛溶液备用 (-20℃ 保存)。称取 9-苄基氯甲酸甲酯 50 mg, 用乙腈溶解并稀释至 10 mL, 配成 0.5% 的 9-苄基氯甲酸甲酯溶液备用 (-20℃ 保存)。

2.3 AAA 法缓冲溶液的制备 按仪器说明书配制分析用柠檬酸缓冲液, 第一缓冲液 (pH 3.28, 0.20 mol/L Na⁺); 第二缓冲液 (pH 3.19, 0.35 mol/L Na⁺); 第三缓冲液 (pH 4.95, 1.40 mol/L Na⁺); 再生溶液 (NaOH, 0.20 mol/L Na⁺)。

2.4 色谱条件

2.4.1 RP-HPLC 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX-Extend C₁₈ 柱 (5 mm×250 mm, 5 μm, Agilent 公司); 流动相 A 液为 0.02 mol/L 醋酸钠 (pH=7.20)-四氢呋喃-三乙胺 (99:1:0.1), 流动相 B 为甲醇-乙腈-0.02 mol/L 醋酸钠 (pH=7.20) (175:225:100); 梯度程序以纯 A 液开始, 递增 B 液百分比, 具体增幅如下: 0 min, 100% A; 17 min, 50% B; 19 min, 50% B; 21 min, 100% B; 21.1 min, 100% B; 21.5 min, 100% B (流速为 1.5 mL/min); 26.5 min, 100% B; 28.0 min, 100% B; 28.0~30.0 min, 100% A。流速除 21.5~26.5 min 为 1.5 mL/min 外, 余皆为 1.0 mL/min。柱温 25℃。紫外检测波长: 0~21.5 min 为 338 nm, 21.6 min 开始为 262 nm。

2.4.2 AAA 测定条件 离子交换树脂 2619, 时间 60 min, 缓冲液流速 0.225 mL/min, 茚三酮流速 0.3 mL/min, 缓冲液泵压 8~12 MPa, 茚三酮泵压 1.5~3.5 MPa, 缓冲液改变次数 5; 柱温 53℃。检测波长为 440 nm 和 570 nm。

2.5 样品处理和进样

2.5.1 RP-HPLC 法 精密称取 115.10 mg 多维氨基酸片粉末溶解在 100 mL 0.1 mol/L HCl 中, 0.22 μm 滤膜过滤, 10 μL 进样。样品的 HPLC 分离图谱见图 1。对照品重复进样的峰面积 RSD < 1.5% (n=3), 最小检测量为 3 pmol, 各种氨基酸的平均回收率为 98.76% (n=3)。

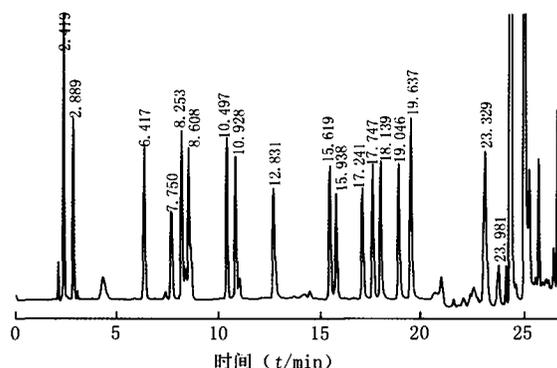


图 1 多维氨基酸片的 HPLC 谱图

Fig 1 The HPLC chromatogram of multi-amino-acid tablets

(出峰依次为: Asp, Glu, Ser, His, Gly, Thr, Ala, Arg, Tau, Tyr, Val, Met, Trp, Phe, Ile, Leu, Lys, Pro)

2.5.2 AAA 法 精密称取多维氨基酸片粉末 18.17 mg, 用 30 mL 6 mol/L HCl 水解, 普通新华滤纸过滤, 50 μL 进样, 采用柠檬酸钠系统进行标准分析, 样品的氨基酸分析仪分离图谱见图 2。各种氨基酸的平均回收率为 95.14%, RSD < 3% (n=3), 最小检测量为 30 pmol。两种方法的测量结果比较见表 1。

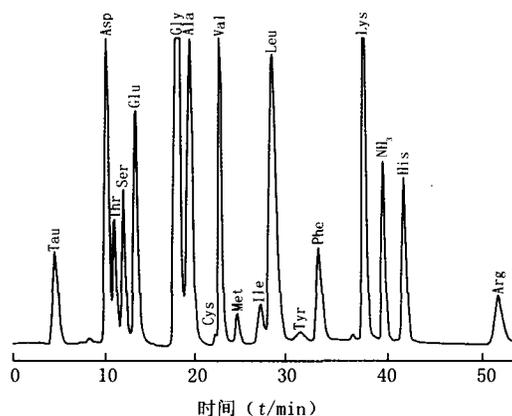


图 2 多维氨基酸片的氨基酸全自动分析仪法分析图谱

Fig 2 The amino acid analyzer chromatogram of multi-amino-acid tablets

表1 HPLC法和氨基酸分析仪法的
变异系数及测量结果比较Table 1 The comparison of coefficient of variation and
test results between HPLC method and amino acid
analyzer method

编号	氨基酸	RSD(%)		样品中氨基酸 含量(mg/g)		两种方 法相对 偏差 (%)
		HPLC法	AAA法	HPLC法	AAA法	
1	Asp	1.17	2.82	49.216	53.214	5.52
2	Glu	1.35	1.21	7.201	6.386	8.48
3	Ser	1.32	1.78	23.311	24.512	3.55
4	His	1.17	1.26	34.113	29.814	9.51
5	Gly	1.19	1.39	27.459	29.293	4.57
6	Thr	1.32	1.78	34.593	32.585	4.23
7	Ala	1.47	1.49	61.920	62.134	0.24
8	Arg	1.14	1.78	121.323	105.906	9.60
9	Tau	1.49	1.69	29.491	31.747	5.21
10	Tyr	1.01	1.77	9.015	9.213	1.54
11	Val	1.42	2.67	44.787	47.256	3.79
12	Met	1.17	1.35	32.445	28.651	8.78
13	Trp	1.04	1.09	22.334		
14	Phe	0.95	1.33	35.610	40.561	6.70
15	Ile	1.19	1.89	22.590	20.613	6.47
16	Leu	1.23	1.79	61.653	55.100	7.94
17	Lys	0.93	2.83	87.702	94.970	5.63
18	Pro	1.00	2.19	21.585	24.356	5.74

3 讨论

实验中作者采用的仪器是 Agilent 公司的 HPLC 分离系统和日立 835-50 氨基酸分析仪。实验结果表明,RP-HPLC 法的 RSD<1.5%,最小检测量为 3 pmol;AAA 法的 RSD<3%,最小检测量为 30 pmol。从这两个方面来说,RP-HPLC 方法优于 AAA 法。但近期的资料显示^[4],最新的氨基酸分析仪的峰面积 RSD 可<1.5%,最小检测量可达 3 pmol,并且长时间的重现性也很好。由于国内使用的氨基酸分析仪大多是老式的,精密度稍许差些。采用 RP-HPLC 法测定一个氨基酸样品只需要 30 min 左右,而作者使用的氨基酸分析仪分析一个样品需要 60 min 左右,最新的氨基酸分析仪可用 30 min 分析完一个样品^[4],但对缓冲液和样品的要求较高。

采用氨基酸分析仪,常用的氨基酸样品的预处理方法是酸水解。由于色氨酸在酸中分解,因此如

果采用的是酸水解,无法准确测定色氨酸的含量,必须采用碱水解,方可测量色氨酸的含量。所以测定一个氨基酸产品可能需要进样两次,才能得到全面的结果。本实验中仅采用了酸水解样品,所以表 1 中无色氨酸的 AAA 法测定结果。本次实验中 RP-HPLC 法只需要配制好衍生液,放入仪器,仪器根据预先设定的程序自动进行衍生。一级氨基酸与邻苯二甲醛衍生,二级氨基酸与 9-苄基氯甲酸甲酯柱前衍生,生成物经 RP-HPLC 分离,从而测定氨基酸的含量。但该方法不能测定半胱氨酸(Cys)的含量,Cys 中的巯基将同 2-巯基乙醇发生竞争性反应。所以表 1 中没有对半胱氨酸的结果进行比较。如果要测定半胱氨酸,可以通过将样品先与二硫代二丙酸(DTDPA)反应,然后生成物作为一级氨基酸衍生,从而分离测定半胱氨酸的含量。

从表 1 可以看出,两种方法所测定的每种氨基酸的含量是具有相关性的。如果不计色氨酸,将表中的两列氨基酸含量进行线性回归,可得到一个回归方程 $y = 0.9244x + 2.6797$,相关系数 $r = 0.9845$ 。统计学上两者有一定的相关性,但测量结果之间还是存在差异。采用配对 t 检验,对两组数据进行检验,得出 $P = 0.3625$,说明差异不具有显著性意义。两种测定方法的平均相对偏差为 5.74%,最大可达 9.60%(Arg),最小为 0.24%(Ala)。

从本研究结果看出,RP-HPLC 法似乎优于氨基酸分析仪法。由于人们在选择实验时常采用一种仪器,所以这方面的数据很有限。新型的氨基酸分析仪可能在性能上有所改善,希望将来有更多的关于两种方法测量结果进行比较的数据。

[参考文献]

- [1] 于泓,牟世芬. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. 分析化学, 2005,33(3):398-404.
- [2] 陈日来,陈得光,任斌,等. RP-HPLC 法测定正常人血浆中 14 种氨基酸[J]. 华西药学杂志,1999,14(3):159-162.
- [3] 潘葳,郭根和,苏德森,等. 反相高效液相色谱法与离子交换色谱法测定氨基酸比对[J]. 现代科学仪器,2004,3(1):25-28.
- [4] 劳燕文. 日立 835 与 8800 氨基酸分析仪的应用与比较[J]. 现代仪器,2004,10(4):52-53.

[收稿日期] 2005-12-19

[修回日期] 2006-04-26

[本文编辑] 刘军政 姚春芳