

中华人民共和国国家标准

化学试剂 氨基酸测定通则

GB 13648—92

Chemical reagent

General rules for the determination of amino acids

1 主题内容与适用范围

本标准规定了氨基酸含量、熔点、比旋光度、层析试验和灼烧残渣测定的通用方法。

本标准适用于氨基酸及其衍生物的分析。

本标准不适用于药用氨基酸的分析。

2 引用标准

GB 601 化学试剂 滴定分析(容量分析)用标准溶液的制备

GB 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB 608 化学试剂 氮测定通用方法

GB 613 化学试剂 比旋光度测定通用方法

GB 617 化学试剂 熔点范围测定通用方法

GB 6682 实验室用水规格

GB 9008 液相色谱法术语 柱液相色谱法和平面色谱法

GB 9741 化学试剂 灼烧残渣测定通用方法

3 一般规定

3.1 本标准中所用的水,在没有注明其他要求时,应符合 GB 6682 中三级水的规格。

3.2 本标准中所用试剂的纯度应在分析纯以上。

3.3 本标准中凡层析测定时,氨基酸的 R_f 值均应以在完全相同条件下的标准样品或工作标准样品的 R_f 值为判断标准,且每次测定时都不得省去作为判断标准的标准样品或工作标准样品。

3.4 本标准中凡层析测定需做杂质限量检测时,应使用符合 6.1.2.2 条规定的工作标准样品。

4 熔点测定

按 GB 617 之规定测定。

氨基酸的熔点数值可参考附录 B(参考件)。

5 比旋光度的测定

按 GB 613 之规定测定。

氨基酸的比旋光度数值可参考附录 B(参考件)。

DL 型氨基酸的比旋光度应控制在 $0 \pm 0.5^\circ$ 范围之内。

国家技术监督局 1992-09-01 批准

1993-07-01 实施

6 层析试验

层析试验用于检测氨基酸的纯度及定性鉴别。所有氨基酸均应从下列方法中选择一种方法进行测定。

6.1 纸层析

6.1.1 方法原理

纸层析法是以滤纸为惰性支持物的一种层析法。分离原理属分配层析的范畴,它利用不同溶质在静止的水相,亦即纸上所吸附的水为固定相和沿纸流动的有机相(即流动相)两相溶剂间的不断分配而达到分离的目的。氨基酸经层析后,常用比移值(R_f)来表示各组分在层析谱中的位置。 R_f 值按式(1)计算:

$$R_f = \frac{d_s}{d_m} \dots\dots\dots(1)$$

式中: R_f ——比移值;

d_s ——溶质迁移距离,cm;

d_m ——流动相迁移距离,cm。

在一定的条件下,同一氨基酸的 R_f 值是一定的,但由于影响 R_f 值的因素较多,一般都采用与标准物质对比,即根据试样与标准物质在层析谱中 R_f 值来进行鉴别,并可根据显色后杂质斑点的多少和色量来确定试样纯度。

6.1.2 试剂及材料

6.1.2.1 标准样品

纸层析和薄层层析用标准样品,纯度不小于99.5%。

6.1.2.2 工作标准样品

须经标准样品验证,主体含量不应少于98.0%。

6.1.2.3 层析用纸

层析用纸是指具有一定强度,质地均匀平整的纯棉浆制成的滤纸。纸的裁切方向应使流动相能顺着纹理方向移动。定性用的层析滤纸灰分须小于0.1%。

一般可选用新华一号层析滤纸。

6.1.2.4 显色剂(常用显色剂)

称取4g茚三酮(苯骞戊三酮),溶于1000mL乙醇(无水)中,置于棕色瓶内保存。茚三酮除对脯氨酸和羟脯氨酸产生黄色外,其他氨基酸均产生紫色。氨基酸的特殊显色剂可参照附录C(参考件)。

6.1.2.5 展开剂

展开剂可参照附录A(参考件)之规定使用前制备。

必要时可选用其他展开剂。

6.1.2.6 展开室

可选用大小适宜的标本缸。

6.1.3 操作步骤

取新华一号层析滤纸,长30cm,离底边2cm处用铅笔划一直线,在直线两端2cm处开始点样,点与点之间距离为2cm,点样扩散的直径不超过0.5cm。每点下面须用铅笔注明试样的名称和点样的量。同一张层析纸上可点数个试样,纸的宽度取决于试样的数目,并留有点标准样品或工作标准样品的位置。

称取0.005g氨基酸试样,精确至0.0001g。溶于0.5mL水或盐酸溶液($c(\text{HCl})=0.5\text{mol/L}$)中,稀释至5mL。用微量进样器或微量吸管点样,每次点样后须用冷风吹干,点样量按检测要求不少于5 μL ,不多于10 μL ,即相当于50 μg 和100 μg 。

氨基酸纸层析一般上行即可,可将已吹干的层析纸两边卷成圆筒状,用二根塑料丝上下固定。在一

高为 36 cm 的标本缸内平放一培养皿,内盛高度为 0.5 cm 的展开剂,将层析纸置于缸内以展开剂的饱和蒸气平衡 2 至 4 h 后,试样端朝下放入培养皿中,盖紧玻璃盖。展开 12 至 16 h 后,流动相前沿即可上升 27 至 29 cm,此时将层析纸取出晾干或 50℃干燥,按 6.1.4 条之规定显色。

6.1.4 显色

将已除去溶剂的层析纸喷以显色剂,冷风吹干后于 50~60℃保温 15~20 min 即可显出有色斑点。

6.1.5 结果的确定

6.1.5.1 以 100 μg 点样量,按规定展开并显色后,只显出一个斑点,且与标准样品或工作标准样品的 R_f 值一致即为层析试验合格。

6.1.5.2 以 100 μg 点样量,按规定展开并显色后,除显一个主斑点外,其他氨基酸的斑点小于或等于按产品规格规定制备的杂质标准的斑点时,即可确定含其他氨基酸小于或等于标准。

6.2 薄层层析

6.2.1 方法原理

薄层层析是一种将吸附剂均匀地铺在一块玻璃板上形成一薄层,在此薄层上进行色层分离的一种层析法,按分离机理可以分为吸附、分配、离子交换、凝胶过滤等法。本标准主要使用吸附薄层层析法。

6.2.2 试剂及材料

6.2.2.1 标准样品

应符合 6.1.2.1 条之规定。

6.2.2.2 工作标准样品

应符合 6.1.2.2 条之规定。

6.2.2.3 硅胶 G

本品系白色均匀细粉,粒度平均在 10~40 μm 之间,含有约 13% 的半水硫酸钙。本品应符合下列分离要求:各取 0.040 g 二甲基黄、苏丹 III、靛酚蓝,溶于 100 mL 苯中。取 2 μL,点样于按 6.2.3.1 条之规定制备的硅胶 G 板上,用苯展开 10 cm,色谱图应显示三个清晰的分离斑点,靛酚蓝斑点接近于起始点,二甲基黄在色谱图的中央,苏丹 III 介于二者之间。

6.2.2.4 纤维素粉(微晶形)

本品为白色均匀细粉,平均粒度小于 30 μm。本品应符合下列分离要求:各取 0.025 g 亮黑、鸡冠红、快黄、金莲橙,溶于 100 mL 甲醇和水的混合溶液(1+1)中。取 10 μL,点样于按 6.2.3.1 条之规定制备的纤维素板上,以丙醇+乙酸乙酯+水的混合溶液(10+1+4)为展开剂,上行 10 cm,色谱图应显示四个清晰的分离斑点,即黑色斑点、红色斑点,两个黄色斑点, R_f 值依次增加。

6.2.2.5 展开剂

应符合 6.1.2.5 条之规定。

必要时可选用其他展开剂。

6.2.2.6 显色剂

参照 6.1.2.4 条之规定。

6.2.3 操作步骤

6.2.3.1 制板

制备薄层板所用的玻璃板必须表面光滑、清洁,其大小可根据需要选择,小的可用载玻片,大的可裁成 20 cm×20 cm 的玻璃片。

取一定量的吸附剂(硅胶 G 可按 25~30 g 加 60~65 mL 水;纤维素粉可按 8 g 加 48 mL 水、2 mL 乙醇)在研钵中加水调成糊状,按玻璃板的尺寸取一定量的吸附剂糊均匀地铺成一厚度为 0.2~0.3 mm 的薄层。若使用涂铺器可按制造厂商推荐的方法涂铺。铺成的薄层须置于水平台上室温干燥过夜。

硅胶 G 制板的时间从调糊状到铺板不应超过 1.5 min。

氨基酸及氨基酸衍生物应使用在空气中干燥(不经过加热)的薄层板。

市售的预制板经 6.2.2.3 条或 6.2.2.4 条试验符合分离要求的亦可使用。

6.2.3.2 点样和展层

取薄层板一块,在距底边 1.5 cm 处开始点样,点与点之间的距离为 1.5 cm,点样扩散的直径不超过 0.2 cm。如需多次点样时,可用冷风将第一次点样吹干后,再点第二次。试样称取、溶解及点样用的器具应参照 6.1.3 条之规定。

薄层层析可选用大小适宜的标本缸。薄层板浸入展开剂的深度不超过 0.5 cm,上行至流动相前沿离顶端 0.5 cm 处(展开距离一般不超过 15 cm)取出,在 50℃ 干燥除去溶剂。

6.2.3.3 显色

将已除去溶剂的薄层板喷以显色剂,冷风吹干后于 50~60℃ 保温 15~20 min 即可显出有色斑点。

6.2.4 结果的确定

应符合 6.1.5.1 条及 6.1.5.2 条之规定。

7 含量测定

氨基酸的含量通常可按下述两种方法之一进行测定。

7.1 氮测定法

按 GB 608 之规定测定。

本方法适用于全部氨基酸的含量测定。

7.2 非水滴定法

7.2.1 适用范围

本方法适用于能溶于乙酸(冰醋酸)的具有碱性的氨基酸样品的含量测定,不适用于氨基酸盐酸盐样品的含量测定。

7.2.2 试剂

7.2.2.1 高氯酸标准滴定溶液 [$c(\text{HClO}_4)=0.1 \text{ mol/L}$]

按 GB 601 之规定制备。

7.2.2.2 结晶紫指示液的制备

称取 0.20 g 结晶紫,溶于乙酸中,用乙酸(冰醋酸)稀释至 100 mL。

7.2.3 氨基酸含量测定

按产品标准的规定,称取一定量的试样,精确至 0.0001 g。置于干燥的锥形瓶中,加 50 mL 乙酸溶解,加 2 滴结晶紫指示液(7.2.2.3),用高氯酸标准滴定溶液(7.2.2.1)滴定至溶液呈蓝绿色。同时做空白试验。

含量按式(2)计算:

$$w = \frac{(V_1 - V_2)c \cdot M}{m} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中: w ——氨基酸的含量, %;

V_1 ——样品消耗高氯酸标准滴定溶液的体积, mL;

V_2 ——空白试验消耗高氯酸标准滴定溶液的体积, mL;

c ——高氯酸标准滴定溶液的浓度, mol/L;

M ——与 1.00 mL 高氯酸标准滴定溶液 [$c(\text{HClO}_4)=1.000 \text{ mol/L}$] 相当的,以克表示的氨基酸的质量;

m ——试样的质量, g。

8 灼烧残渣

按 GB 9741 之规定测定。

附录 A
常用氨基酸展开剂的组成和配比表
(参考件)

展开剂	配比(体积比)	说明
1. 正丁醇+乙酸+乙醇(无水)+水	4+1+1+2	纸层析常用展开剂
2. 仲丁醇+甲酸(84%)+水	15+3+2	
3. 正丁醇+甲基乙基丁酮+氨水+水	5+3+3+1	纸层析分离苏氨酸和别苏氨酸的展开剂
4. 仲丁醇+氨水(3%)	15+6	纸层析常用展开剂
5. 正丁醇+丙酮+二环己胺+水	10+10+2+5	纸层析分离碱性氨基酸常用展开剂
6. 正丁醇+丙酮+二乙胺+水	10+10+2+5	薄层层析常用展开剂
7. 异丙醇+甲酸(84%)+水	40+2+10	
8. 苯+吡啶+乙酸	8+20+2	
9. A+B	3+7	薄层层析分离氨基酸衍生物常用展开剂
A:吡啶+乙酸+水	1+1+1.5	
B:乙酸乙酯+异丙醇	10+4	
10. 正丁醇+乙酸+水	4+1+1	

附录 B
常用氨基酸的比旋光度和熔点
(参考件)

表 B1

中文名称	英文名称(缩写)	相对分子质量	熔点, °C ¹⁾	溶解度 ²⁾	比旋光度 ³⁾ $[\alpha]_D^{20-25}$
DL-丙氨酸	DL-alanine(Ala)	89.09	295 <i>d</i>	16.6	
L-丙氨酸	L-alanine(Ala)	89.09	297 <i>d</i>	16.65	[A]+14.6
DL-精氨酸	DL-arginine(Arg)	174.20	238 <i>d</i>		
L-精氨酸	L-arginine(Arg)	174.20	244 <i>d</i>	15.0 ⁽¹¹⁾	[A]+27.6
DL-天冬酰胺	DL-asparagine (Asp-NH) (Asn)	132.12	213~215 <i>d</i>	2.15	
L-天冬酰胺	L-asparagine (Asp-NH) (Asn)	132.12	236 <i>d</i> (水合物)	2.989	[C]+28.6
L-天冬氨酸	L-aspartic acid(Asp)	133.30	269~271	0.5	[A]+25.4
L-瓜氨酸	L-citrulline(Cit)	175.19	234~237 <i>d</i>	易溶	[A]+24.2
L-半胱氨酸	L-cystine(Cys)	121.15		易溶	[A]+6.5
DL-胱氨酸	DL-cystine(Cyss)	240.29	260	0.0049	
L-胱氨酸	L-cystine(Cyss)	240.29	258~261 <i>d</i>	0.011	[A]-232

续表 B1

中文名称	英文名称(缩写)	相对分子质量	熔点, °C ¹⁾	溶解度 ²⁾	比旋光度 ³⁾ $[\alpha]_D^{20-25}$
DL-谷氨酸	DL-glutamic acid(Glu)	147.13	225~227d	2.054	
L-谷氨酸	L-glutamic acid(Glu)	147.13	247~249d	0.864	[A]+31.8
L-谷氨酰胺	L-glutamine (Glu-NH) (Gln)	146.15	184~185	4.25	[A]+31.8
甘氨酸	Glycine(Gly)	75.07	292d	24.99	
DL-组氨酸	DL-histidine(His)	155.75	285~286d	易溶	
L-组氨酸	L-histidine(His)	165.16	277d	4.16	[B]-38.5
L-羟脯氨酸	L-hydroxyproline (Pro-OH) (Hyp)	131.13	270d	36.11	[A]-50.5 [B]-76
DL-异亮氨酸	DL-isoleucine(Ile)	131.17	292d	2.229	
L-异亮氨酸	L-isoleucine(Ile)	131.17	285~286d	4.12	[A]+30.5
DL-亮氨酸	DL-leucine(Len)	131.17	332d	0.991	
L-亮氨酸	L-leucine(Len)	131.17	337d	2.19	[A]+16.0 [B]-11.0
DL-赖氨酸	DL-lysine(Lys)	145.70			
L-赖氨酸	L-lysine(Lys)	140.19	224d	易溶	[A]+25.9 [B]+13.5
DL-甲硫氨酸 (蛋氨酸)	DL-methionine(Met)	140.21	281	3.38	
L-甲硫氨酸	L-methionine(Met)	140.21	288d	易溶	[A]+23.2 [B]-10.0
DL-苯丙氨酸	DL-phenylalanine(Phe)	165.19	318~320d	3.42	
L-苯丙氨酸	L-phenylalanine(Phe)	165.19	283~284d	2.96	[B]-34.5
DL-脯氨酸	DL-proline(Pro)	115.13	213	易溶	
L-脯氨酸	L-proline(Pro)	115.13	220~222d	162.3	[A]-60.3 [B]-86.2
DL-丝氨酸	DL-serine(Ser)	105.09	246d	50.2	
L-丝氨酸	L-serine(Ser)	105.09	223~226d	26	[A]+15.1 [B]-7.5
DL-苏氨酸	DL-threonine(Thr)	119.12	235分解点	20.1	
L-苏氨酸	L-threonine(Thr)	219.12	253分解点	易溶	[A]-15.0 [B]-28.5
DL-色氨酸	DL-tryptophane(Trp)	204.22	283~285	0.25 ⁽³⁰⁾	
L-色氨酸	Ltryptophant(Trp)	204.22	281~282	1.14	[A]+2.8 [B]-33.7
DL-酪氨酸	DL-tyrosine(Tyr)	181.19	316	0.035 1	
L-酪氨酸	L-tyrosine(Tyr)	181.19	342.4d	0.045	[A]-10.0
DL-缬氨酸	DL-valine(Val)	117.15	293d	7.04	

续表 B1

中文名称	英文名称(缩写)	相对分子质量	熔点, °C ¹⁾	溶解度 ²⁾	比旋光度 ³⁾ $[\alpha]_D^{20-25}$
L-缬氨酸	L-valine (Val)	117.15	315 d	8.85 ⁽²⁰⁾	[A]+28.3 [B]+5.63

注: 1) d 代表达到熔点后分解。

2) 在25°C于100 g水中溶解的质量。特殊的温度条件则注明在右上角。

3) [A]加50~200 mg试样于10 mL 15%盐酸中; [B]加50~200 mg试样于10 mL水中; [C]加951.9 mg试样于10%盐酸中。

附录 C

氨基酸的特殊显色剂

(参考件)

C1 甘氨酸显色剂

C1.1 试剂

试剂甲: 称取0.20 g邻苯二甲醛, 溶于100 mL丙酮中。

试剂乙: 称取1.0 g氢氧化钾, 溶于100 mL 95%乙醇中。

C1.2 显色

把层析纸在试剂甲中浸拉后, 于100°C干燥, 再于试剂乙中浸拉, 于100°C干燥10 min。甘氨酸显绿色。

C2 酪氨酸显色剂

C2.1 试剂

试剂甲: 称取0.10 g 1-亚硝基-2-萘酚, 溶于100 mL乙醇溶液(75%)中。

试剂乙: 量取15 mL硝酸, 稀释至100 mL。

C2.2 显色

层析纸上先喷试剂甲, 吹干后, 再喷试剂乙, 100°C保温3 min。酪氨酸或含酪氨酸的多肽显红色, 其底色为浅绿色, 放置30 min后斑点转为桔红色, 其后渐褪去。

C3 组氨酸和酪氨酸的显色剂

C3.1 试剂

试剂甲: 称取4.50 g对氨基苯磺酸, 加45 mL盐酸, 加热溶解, 稀释至500 mL。在0°C将此溶液与等体积的亚硝酸钠溶液(50 g/L)混合。

试剂乙: 碳酸钠溶液(100 g/L)。

C3.2 显色

层析纸上先喷试剂甲, 片刻后再喷试剂乙。组氨酸显桔红色, 酪氨酸显红色。

C4 丝氨酸和羟脯氨酸的显色剂

C4.1 试剂

试剂甲: 称取6.75 mg高碘酸钠, 加甲醇溶解, 加2滴盐酸溶液(20%), 用甲醇稀释至100 mL。

试剂乙: 称取15.0 g乙酸铵, 加0.3 mL乙酸(冰醋酸), 加1 mL乙酰丙酮, 用甲醇稀释至100 mL。

C4.2 显色

层析纸上先喷试剂甲,近干后再喷试剂乙,室温放置2 h。在紫外灯(波长:254~340 nm)下照30 min,丝氨酸和羟脯氨酸都显黄色,并都具有荧光。

C5 精氨酸显色剂

C5.1 方法一

试剂甲:称取5.0 g 尿素,溶于100 mL α -萘酚-乙醇溶液(0.1 g/L)中。按每100 mL 溶液加3 g 氢氧化钾于使用前制备。

试剂乙:取0.7 mL 溴水,加100 mL 氢氧化钠溶液(50 g/L),混匀。

C5.2 方法二

试剂甲:称取0.10 g 8-羟基喹啉,溶于100 mL 丙酮中。

试剂乙:取1 mL 溴水,加500 mL 氢氧化钠溶液(20 g/L),混匀。

C5.3 显色

方法一和方法二均先喷试剂甲,吹干后再喷试剂乙,精氨酸显红色斑点。

C6 脯氨酸

C6.1 试剂

称取1.0 g 吡啶酮、1.50 g 乙酸锌,加1 mL 乙酸(冰醋酸)、5 mL 水及95 mL 异丙醇混合溶解。

C6.2 显色

层析纸上喷此显色剂后,在80~85℃保温30 min。脯氨酸显蓝色,以30℃温水洗去多余的显色剂后,背景为白色或浅黄色。

C7 色氨酸

C7.1 试剂

称取1.0 g 对二甲氨基苯甲醛,溶于95 mL 95%乙醇中,加5 mL 盐酸,混匀。

C7.2 显色

层析纸上喷此显色剂后,吹干,色氨酸显紫色。

附加说明:

本标准由中华人民共和国化学工业部提出。

本标准由北京化学试剂总厂归口。

本标准由中国科学院上海生物化学研究所东风生化技术公司负责起草。

本标准主要起草人陆之贤。