

## 氨基酸分析方法

### 一. 仪器及试剂

#### 仪器:

- 1). 天平一台（精度0.1mg）；
- 2). 恒温水浴锅一台；
- 3). 容量瓶；
- 4). 试管（1.5×15cm或1.5×10cm）；
- 5). 微量进样器（5ul或10μl）一支；
- 6). 微量可调移液枪（1000ul）一支、吸头多个；
- 7). 旋涡混匀器一台；
- 8). HPLC系统及氨基酸分析专用柱（4.6×250mm）；

#### 试剂:

- 1). 超纯水（ $\geq 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）；
- 2). 乙腈（HPLC级）；
- 3). 三水合醋酸钠（分析纯）；
- 4). 冰醋酸（分析纯）；
- 5). 衍生试剂A和衍生试剂B溶液，至于冰箱保存（衍生试剂包对身体有害，用时请做好防护措施）；
- 6). 正己烷（HPLC级）。

### 二. 流动相的配制

**流动相A:** 0.1mol/L醋酸钠溶液（pH 6.5）：乙腈=93：7

配制方法：准确称取三水合醋酸钠13.6g于1000ml水中，搅拌均匀，使之溶解，用冰醋酸或氢氧化钠溶液调pH值至6.5；准确量取配制好的三水合醋酸钠溶液465ml和乙腈35ml，混合均匀，抽滤过0.45μm滤膜；

**流动相B:** 水：乙腈=20：80

配制方法：准确量取水100ml和乙腈400ml，混合均匀，抽滤过0.45μm滤膜；

### 三. 衍生化反应

#### 1. 对照品溶液的制备

取伍丰公司EXFORMMA 17种氨基酸对照品溶液用水稀释至原来浓度的1/10倍稀释作为对照品。

伍丰公司EXFORMMA 17种氨基酸对照品溶液稀释10倍后，各氨基酸的浓度为：

Name	M.W.	C(mmol/L)	C(mg/ml)	Name	M.W.	C(mmol/L)	C(mg/ml)
门冬氨酸	133.10	0.25	0.03328	胱氨酸	240.30	0.125	0.03004
谷氨酸	147.13	0.25	0.03678	缬氨酸	117.15	0.25	0.02929
丝氨酸	105.09	0.25	0.02627	蛋氨酸	149.21	0.25	0.03730
甘氨酸	75.067	0.25	0.01877	异亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
组氨酸	155.15	0.25	0.03879	亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
精氨酸	174.20	0.25	0.04355	酪氨酸	181.19	0.25	0.04530
苏氨酸	119.12	0.25	0.02978	苯丙氨酸	165.19	0.25	0.04130
丙氨酸	89.093	0.25	0.02227	赖氨酸	146.19	0.25	0.03655
脯氨酸	115.13	0.25	0.02878				

## 2. 供试品溶液制备

精密量取/称取供试品适量，并配制成相应浓度的溶液备用。

## 3. 衍生步骤

- 1) 将恒温水浴锅预热至 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ；
- 2) 分别将A、B两种衍生试剂用稀释剂稀释至原来浓度的1/5倍；
- 3) 精密量取上述对照品溶液1ml，置于试管中，加入稀释后的A溶液0.5ml和稀释后的B溶液0.5ml，摇匀；在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中加热45分钟，取出，加入正己烷溶液1ml，振摇；并用孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 有机膜过滤，放置30分钟后，取澄清的下层液进行分析试验；
- 4) 供试品的衍生步骤与对照品相同；

## 四. 色谱条件

1. 色谱柱：EXFORMMA Amino Acid,  $5\mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 250\text{mm}$ ;
2. 梯度程序：

流动相A：0.1mol/L醋酸钠溶液（pH 6.5）：乙腈=93：7

流动相B：水：乙腈=20：80

T(min)	A%	B%
0.01	100.0	0.0
11	93.0	7.0
13.9	88.0	12.0
14	85.0	15.0
29	66.0	34.0
32	30.0	70.0
35	0.0	100.0
42	0.0	100.0
45	100.0	0.0
60	100.0	0.0

流 速：1.0ml/min

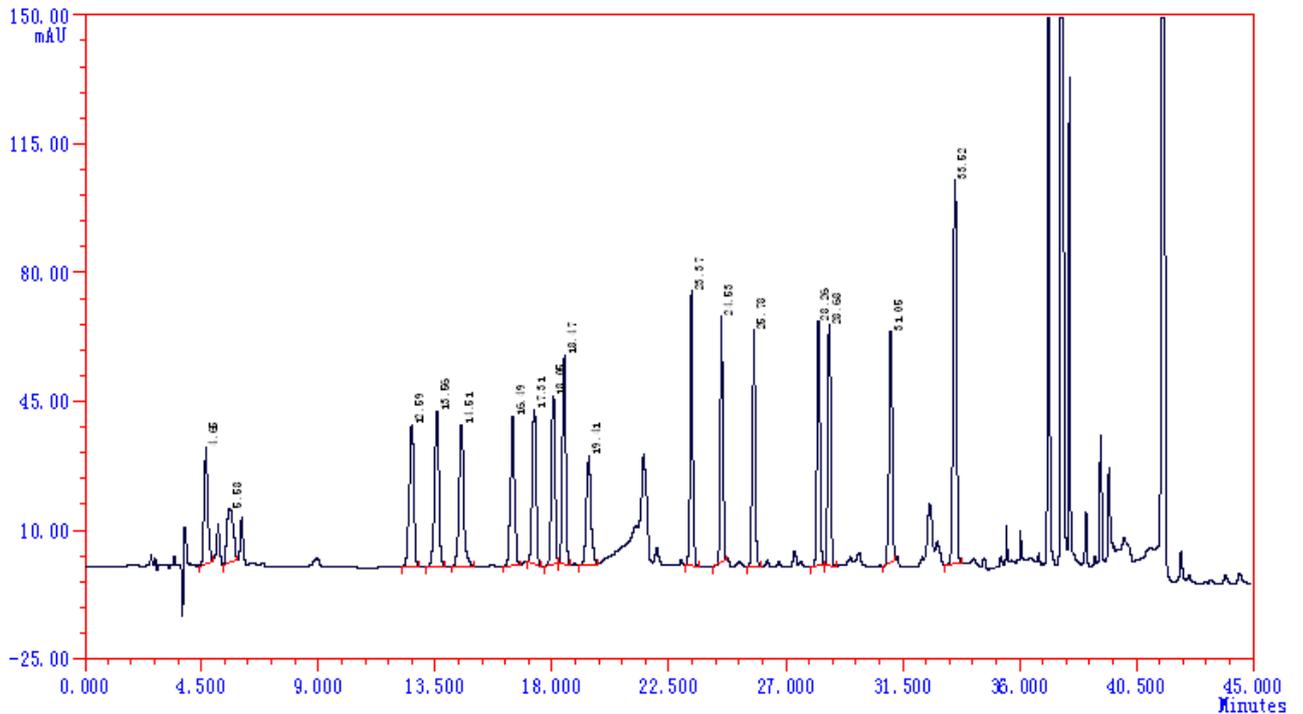
柱 温：40℃

波 长：254nm

进样量：5μl

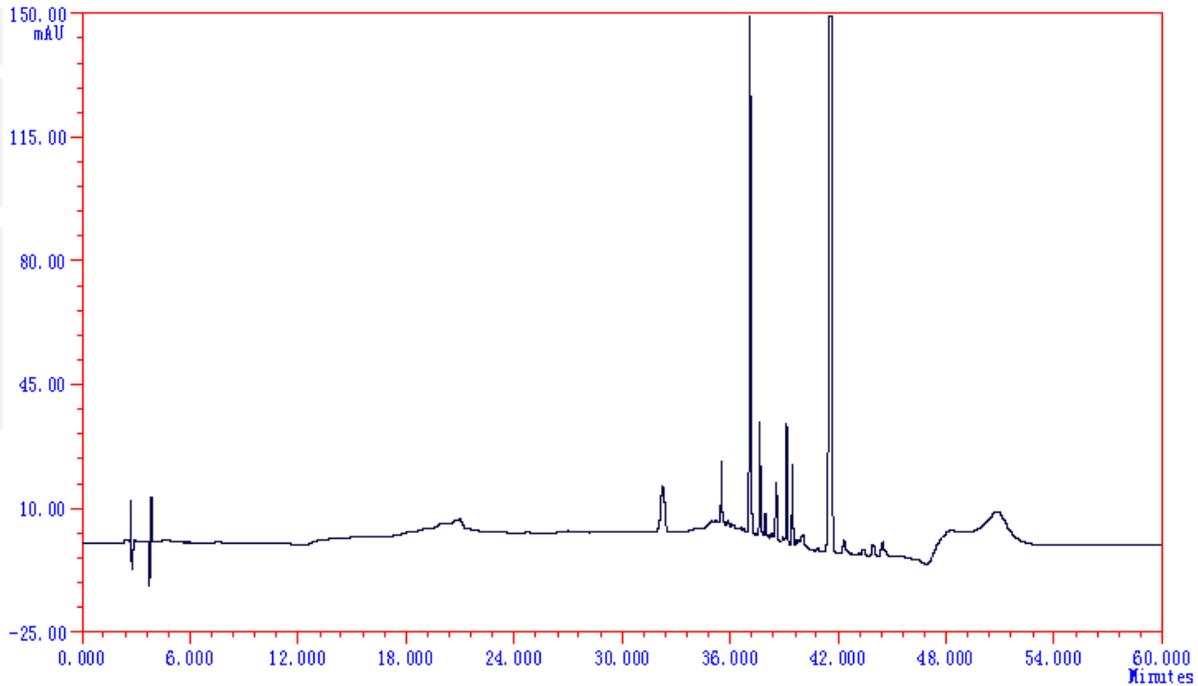
色谱图：

氨基酸标准品



ID	组分名	保留时间	峰高	峰面积	浓度	拖尾因子	理论塔板	分离度
1		4.653	31.75	310.951	3.751	1.28	5092	0.00
2		5.583	14.86	256.108	3.089	1.16	2367	2.58
3		12.592	38.21	461.497	5.567	0.92	24516	17.95
4		13.562	42.15	486.366	5.867	0.92	31158	3.08
5		14.512	38.41	480.798	5.800	1.19	30316	2.97
6		16.487	40.56	454.369	5.481	0.98	48856	6.25
7		17.313	41.98	447.151	5.394	0.89	59594	2.84
8		18.047	45.96	457.552	5.520	1.01	74121	2.67
9		18.470	56.72	510.681	6.160	0.98	94924	1.68
10		19.412	29.65	366.345	4.419	1.09	55675	3.31
11		23.372	74.63	555.032	6.695	1.00	222760	15.02
12		24.533	66.91	489.971	5.911	1.08	253175	5.91
13		25.777	64.27	514.076	6.201	1.01	234252	6.09
14		28.263	66.65	528.798	6.379	1.05	286244	11.72
15		28.680	65.20	515.710	6.221	1.02	296559	1.97
16		31.045	62.72	515.954	6.224	1.03	321250	11.01
17		33.525	104.48	938.339	11.319	0.96	314306	10.82
Σ:			885.11	8289.697	100.0000			

溶解空白:



ID	组分名	保留时间	峰高	峰面积	浓度	拖尾因子	理论塔板	分离度
Σ:			0.00	0.000	0.0000			