

氨基酸类成分以 HPLC-ELSD 进行检测的响应因子分析

赵宇新¹, 李曼玲^{2*}

(1. 国家药典委员会, 北京 100061; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立五种不同的氨基酸的 HPLC-ELSD 分析方法, 并对其响应因子进行分析。方法: Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 × 250mm, 5μm) 为固定相, 柱温 30 °C; 流动相为含 0.1% 三氟醋酸的水, 流速 0.3mL·min⁻¹; ELSD 检测参数为: 漂移管温度 105 °C, 气体流速 2.60L·min⁻¹。通过测定不同氨基酸组分的线性方程, 考察其响应因子。结果: 不同氨基酸线性方程的斜率具有显著的差异。结论: 不同氨基酸 HPLC-ELSD 检测的响应因子具有明显的不同。

[关键词] 响应因子; 蒸发光散射检测器; 氨基酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)03-0016-03

Analysis of the Response Factor of Different Amino Acids Detected by HPLC-ELSD Method

ZHAO Yu-xin¹, LI Man-ling²

(1. State Pharmacopoeia Commission of China, Beijing 100061, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objectives:** To develop the HPLC-ELSD method to detect the different amino acids and analyze the response factors of different constituents detected by ELSD. **Methods:** The stationary phase was Kromasil C₁₈ column(4.6 × 250mm, 5μm) at 30 °C. The mobile phase was water contained 0.1% TFA with flow rate was 0.3mL·min. The chromatogram was recorded by ELSD with drift tube temperature was 105 °C and gas flow rate was 2.60L·min⁻¹. The response factors were analyzed by compare the standard curves of different amino acids. **Result:** The difference between the slopes of standard curves was found. **Conclusion:** The response factor of different amino acids detected by ELSD was greatly different.

[Key words] response factors; ELSD; amino acids

蒸发光散射检测器(ELSD)作为新型的质量型检测器近年来广泛的应用于药物分析的研究中。尤其是应用于皂苷类等弱紫外吸收或无紫外吸收的成分^[1]。只要被检测组分的挥发性小于流动相的挥发性, 都可以在 ELSD 上产生响应。氨基酸类成分大多没有明显的紫外吸收, 多采用氨基酸分析仪和高效液相衍生化法进行分析^[2,3]。氨基酸分析仪对氨基酸的分析也主要是基于柱层析结合在线的分光光度法, 其含量分析的精密密度有待于进一步的提高。

而采用柱前衍生化或柱后衍生化法对氨基酸进行 HPLC 分析, 操作比较繁琐, 并易于从衍生化的过程中引入误差。本文应用 ELSD 作为 HPLC 的检测器, 对 5 种不同的氨基酸进行分析, 实现了氨基酸类成分的 HPLC-ELSD 法检测, 并对不同氨基酸组分在 HPLC-ELSD 检测时的响应因子进行分析。

1 仪器和材料

HP1100 高效液相色谱仪(美国, 安捷伦公司); Alltech 500 型蒸发光散射检测器(Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD)(美国, Alltech 公司); TL9000 数据处理软件(北京, 泰立化公司); HGA-5000 空气发生器(北京, 汇龙公司)。

[收稿日期] 2005-04-20

[通讯作者] 李曼玲, Tel: (010) 64014411-2939

组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸和脯氨酸对照品购自中国药品生物制品检定所。

水为自制高纯水, 三氟乙酸(北京化学试剂公司, 分析纯)。

2 实验和结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 × 250mm, 5μm), 柱温 30℃; 流动相为含 0.1% 三氟醋酸的水, 流速 0.3mL·min⁻¹; ELSD 检测参数为: 漂移管温度 105℃, 气体流速 2.60L·min⁻¹, 各氨基酸组分在 8~9min 之间出峰。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸和脯氨酸适量, 分别用 50% 乙醇溶解配制浓度为 0.20mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 氨基酸类成分 HPLC-ELSD 检测标准曲线的绘制 精密吸取以上各对照品溶液 5、10、15、20、25μL, 注入高效液相色谱仪, 测定其峰面积, 以各氨基酸组分进样质量的常用对数值为横坐标, 以峰面积的常用对数值为纵坐标, 绘制标准曲线并计算回归方程。具体结果见表 1, 图 1。

表 1 氨基酸类组分 HPLC-ELSD 分析时的回归方程

| 氨基酸 | 分子量 | 浓度(mg·mL ⁻¹) | 回归方程 | 相关系数 r |
|-----|-----|--------------------------|------------------------|--------------|
| 组氨酸 | 155 | 0.202 | $Y = 1.3177X + 5.1054$ | $r = 0.9996$ |
| 甘氨酸 | 75 | 0.212 | $Y = 1.6307X + 4.7663$ | $r = 0.9994$ |
| 苏氨酸 | 119 | 0.202 | $Y = 1.2902X + 5.0406$ | $r = 0.9998$ |
| 精氨酸 | 174 | 0.206 | $Y = 1.3471X + 5.0953$ | $r = 0.9995$ |
| 脯氨酸 | 115 | 0.200 | $Y = 1.4452X + 4.7706$ | $r = 0.9999$ |

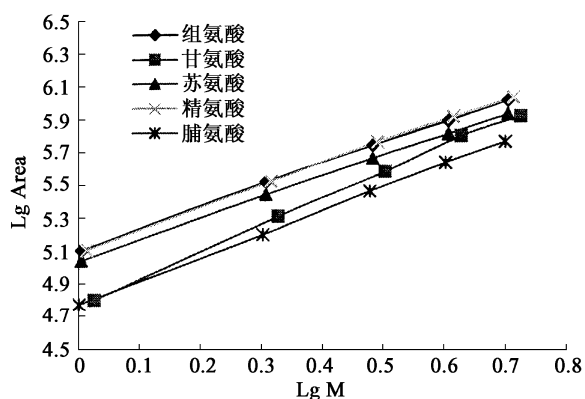


图 1 各氨基酸组分标准曲线

除此之外, 将各氨基酸组分的进样质量和峰面积作图, 见图 2。

3 结果

通过进样质量—峰面积关系图可以发现, 在对照品进样质量基本一致的情况下, 不同的氨基酸组分在 HPLC-ELSD 检测过程中, 其峰面积的相应有明

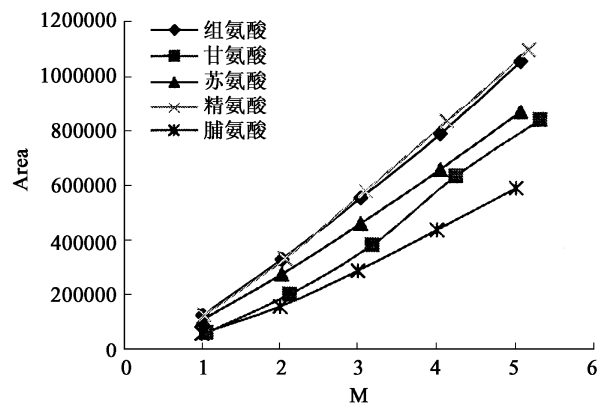


图 2 各氨基酸组分的进样质量—峰面积关系图

显的不同, 其中精氨酸的响应值几乎为脯氨酸的 2 倍。蒸发光散射检测器分析不同的组分时, 其标准曲线的斜率可以反映其响应因子的大小, 响应因子大, 则其标准曲线的斜率值也较大。将进样质量和峰面积分别取常用对数后, 在进行相关性分析计算回归方程, 发现各氨基酸的组分标准曲线斜率的 RSD 为 9.85%, 可以认为各组分的标准曲线斜率之间存在显著的差异。从而可以初步推测, 本文中所涉及的氨基酸的响应因子具有明显的不同。为了进一步探究各氨基酸组分的分子量和响应因子之间的关系, 将各氨基酸组分的分子量和标准曲线的斜率进行做图分析, 见图 3。

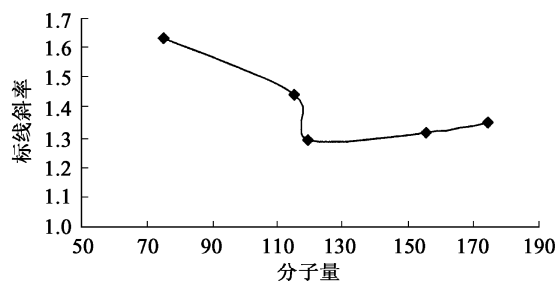


图 3 不同分子量的氨基酸组分标准曲线斜率

通过上图可以明显发现, 本实验中所涉及到的氨基酸类组分标准曲线的斜率与分子量的大小并没有明显的关系。即在 HPLC-ELSD 分析中的响应因子和分子量没有明显的相关性。

4 讨论

本文选择 5 种不同的氨基酸考察 HPLC-ELSD 检测时的响应因子, 在氨基酸类别的选择过程中, 为了保证实验结果的合理性, 所选择的 5 种不同的氨基酸, 在同一色谱条件下保留时间均在 8~9min, 避免了因为保留时间的滞后而引起的色谱峰的展宽带来的误差, 而亮氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸等组分在同一色谱条件下, 其保留时间明显滞后, 所以为了保证实验结果的合理性, 只选择了组氨酸, 甘氨酸, 苏氨酸,

脯氨酸以及精氨酸等 5 种氨基酸作用考察 ELSD 响应因子的组分。

根据 ELSD 原理,物质在 ELSD 上的响应不依赖于被测物质的光学性质,其响应值与被检物质的质量有很大的关系,但色谱柱流出液在 ELSD 漂移管中气溶胶的形成和受到检测是一个非常复杂的过程,受到包括洗脱液的表面张力,液体和气体的线速差,柱流出物的粘度,柱流出物的体积质量等多种因素的影响^[4]。有文献报道表明,在相同的色谱条件下,物理性质类似的物质响应因子近于一致^[5]。但本实验的实验结果表明,不同的氨基酸组分在 HPLC-ELSD 上的响应因子并不一致,并与组分的分子量也没有明显的相关关系。根据实验结果和 ELSD 原理初步推测,物质在 ELSD 上的响应可能即与进样质量有关,也与组分的分子结构和空间构型

有关,有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 赵宇新,李曼玲.蒸发光散射检测器在中药成分分析中的应用[J].中国中药杂志,2002,28(10):913.
- [2] 苗虹,杨涛,霍君生,等.柱前衍生高效液相色谱法测定食物中氨基酸含量[J].分析化学,2000,28(9):1091-1095.
- [3] 王陆黎,张甲生,肖国拾,等.红景天根中氨基酸含量测定[J].白求恩医科大学学报,1999,25(1):26-27.
- [4] Mengerink Y, Man H, Wal S. Use a evaporative light scattering detector in reversed phase high performance liquid chromatography of oligomeric surfacetants[J]. J Chromatogr A, 1991, 552: 593-604.
- [5] Stohyhuo A, Colin H, Guiochon G. Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography[J]. J Chromatogr A. 1983, 265: 1- 18.