

柱前在线衍生法检测培养基中氨基酸的含量

1 前言

培养基，是指供给微生物、植物或动物（或组织）生长繁殖的，由不同营养物质组合配制而成的营养基质。一般都含有水、氮源、无机盐（包括微量元素）、碳源、生长因子（维生素、氨基酸、碱基、抗菌素、色素、激素和血清等）等。培养基既是提供细胞营养和促使细胞增殖的基础物质，也是细胞生长和繁殖的生存环境。其中培养基中氨基酸的检测受到广泛关注，本解决方案参考标准“YY/T 1695-2020 人类辅助生殖技术用医疗器械培养用液中氨基酸检测方法”中的氨基酸分析方法和标准“GB5009.28-2016食品安全国家标准食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定”中的蛋白沉淀方法给出了培养基样品预处理和HPLC在线分析测试方法。

依利特使用最新推出的 EClassical 3200 液相色谱仪和经典的 Supersil AQ-C18 色谱柱，为培养基中对氨基酸检测提出了分析检测解决方案，供相关人员参考使用。

2 仪器设备与试剂

表2-1 氨基酸含量检测HPLC系统标准配置

序号	仪器名称	数量
1	T3200 托盘	1 台
2	D3200 紫外-可见检测器	1 台
3	P3200 高压恒流泵	1 台
4	O3200 色谱柱恒温箱	1 台
5	S3200 自动进样器	1 台
6	Kromstation 数据工作站	1 套
7	Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm	1 支

表 2-2 前处理所需设备

序号	仪器名称	数量
1	梅特勒电子天平（量感 0.0001g）	1 台
2	Sigma 离心机	1 台
3	梅特勒台式 PH 计	1 台
4	超声波清洗器	1 台
5	MiliQ 纯水机	1 台

表 2-3 前处理及样品分析所需试剂

序号	名称	规格级别
1	甲醇	色谱纯
2	乙腈	色谱纯
3	盐酸	（优级纯 36%-38%）
4	磷酸	分析纯
5	氢氧化钠	分析纯
6	亚铁氰化钾	/
7	乙酸锌	/
8	邻苯二醛（OPA）	/
9	9-芴甲氧基氯甲酸甲酯(FMOC)	/
10	乙酰半胱氨酸	分析纯
11	十二水合磷酸氢二钠	分析纯
12	十水合四硼酸钠	分析纯

实验过程中其它玻璃器皿及耗材还包括容量瓶(50 mL、1000 mL)、烧杯(10 mL、1000 mL)、圆底烧瓶(25 mL、100 mL)、量筒(10 mL、25 mL、100 mL、1000 mL)、移液枪(1 mL)及枪头、抽滤瓶(125 mL+抽滤漏斗)、中速定量滤纸、0.45 μm 针筒式过滤器、玻璃棒、50 mL 塑料离心管、一次性塑料滴管、一次性PVC手套、一次性口罩等。

3 样品中的氨基酸含量检测

3.1 样品制备

3.1.1 样品蛋白沉淀:

称2 g样品于50 mL容量瓶中, 加入25 mL水, 超声溶解后加入蛋白沉淀剂(亚铁氰化钾和乙酸锌溶液各2 mL), 混匀后用离心机8000 r/min离心5 min, 清液转移至50 mL容量瓶中。于残渣内加入20 mL水, 混匀后超声5 min, 用离心机8000 r/min离心5 min, 清液转移至之前的50 mL容量瓶中, 加水定容至刻度。

3.1.2 样品衍生:

精密量取对照品溶液50 μ L, 置于5 mL塑料离心管中, 精密加入0.4 mol/L硼酸盐缓冲液(pH 10.2) 250 μ L, 混匀, 精密加邻苯二甲醛溶液50 μ L, 混匀, 放置30 s, 精密加入茚代甲氧基酰氯溶液50 μ L, 混匀, 放置30 s, 精密加稀释剂400 μ L。

3.2 标准品制备:

市售18种氨基酸标准溶液。其衍生方式同样品衍生方法。

3.3 溶液配置:

3.3.1 流动相A: 称取十二水合磷酸氢二钠4.5 g, 十水合四硼酸钠4.75 g, 加水1000 mL, 用盐酸调pH至8.2。

3.3.2 流动相B: 取甲醇450 mL, 乙腈450 mL, 水100 mL, 混匀。

3.3.3 0.4 mol/L硼酸盐缓冲液(pH 10.2): 取硼酸24.73 g, 加水800 mL溶解, 用40%氢氧化钠溶液调pH至10.2, 然后加水稀释至1000 mL。

3.3.4 邻苯二甲醛溶液: 取邻苯二甲醛80 mg, 乙酰半胱氨酸97 mg, 加0.4 mol/L硼酸盐缓冲液(pH 10.2) 7 mL, 加乙腈1 mL溶解。

3.3.5 茚代甲氧基酰氯溶液: 取茚代甲氧基酰氯40 mg, 加乙腈8 mL溶解。

3.3.6 稀释液：取流动相A 100 mL，加磷酸0.5 mL，混匀。

3.3.7 0.1 mol/L盐酸溶液：取盐酸9 mL，加水适量使成1000 mL，摇匀。

3.3.8 0.1 mol/L氢氧化钠溶液：称取4 g氢氧化钠，加新沸过的冷水使成1000 mL，
摇匀。

3.4 色谱条件

流动相梯度：

时间 (min)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0	95	5	1.6
6	90	10	1.6
8	90	10	1.6
10	84	16	1.3
23	58	42	1.0
24	57	43	1.6
30	50	50	1.6
31	0	100	1.6
34	0	100	1.6
35	95	5	1.6
40	95	5	1.6

色谱柱：Supersil AQ-C18 5 μ m 4.6 \times 150 mm

检测波长：338 nm(0-31 min，一级氨基酸)；

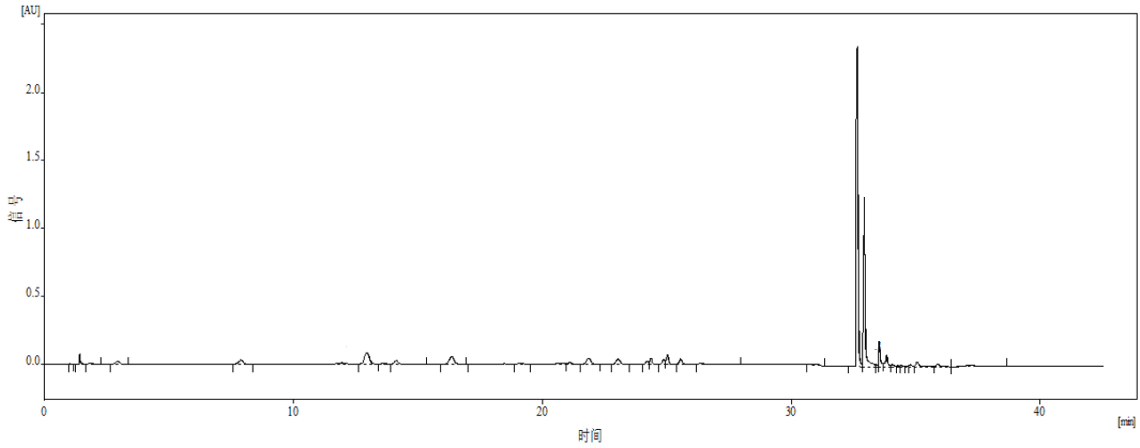
262 nm(31-40 min，二级氨基酸)。

进样体积：40 μ L

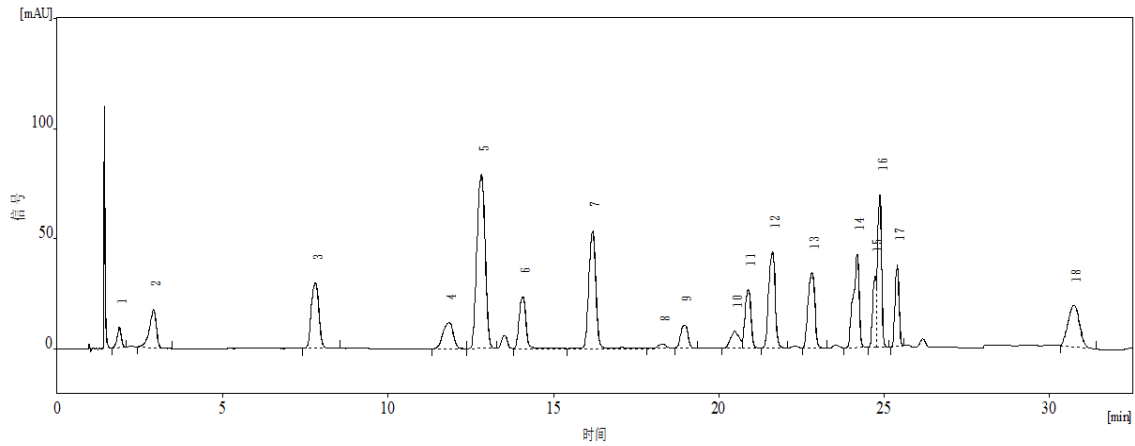
柱温：50 $^{\circ}$ C

4 18种氨基酸混标测试（实验）结果

18种氨基酸分析谱图



18种氨基酸谱图放大图



5 结论

本实验参考标准“YY/T 1695-2020 人类辅助生殖技术用医疗器械培养用液中氨基酸检测方法”中的氨基酸分析方法和标准“GB5009.28-2016 食品安全国家标准食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定”中的蛋白沉淀方法对培养基中氨基酸成分进行分析检测。测试结果数据符合标准要求，结果表明：该系统稳定性良好，定量结果准确。