

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。

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:

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

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(苯骈戊三酮),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。