柱前衍生化 HPLC 法检测谷氨酸钠中的其他氨基酸

杨　锐[#]，许　凯[#]，张　靖，王会娟，肖新月*
（中国食品药品检定研究院，国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室，北京 100050）

摘要：建立了柱前衍生化 HPLC 法测定谷氨酸钠中其他氨基酸（天冬氨酸、丝氨酸、精氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、异苯丙氨酸、组氨酸、盐酸赖氨酸、酪氨酸）的残留量，采用衍生化试剂 2,4- 二硝基氟苯对氨基酸进行衍生化。结果表明，柱前衍生化 HPLC 法具有较好的专属性，上述氨基酸在相应浓度范围内线性关系良好，精密度和稳定性均良好，各氨基酸的平均回收率均在 90.0%～ 110.0%，RSD（n=9）均小于 5%。该方法准确、可靠、重复性好，可用于谷氨酸钠中其他残留氨基酸的测定。

关键词：柱前衍生化；HPLC；氨基酸；谷氨酸钠；2,4- 二硝基氟苯
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)12-1780-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.12.015

Determination of Other Amino Acids in Sodium Glutamate by Pre-column Derivatization HPLC

YANG Rui[#], XU Kai[#], ZHANG Jing, WANG Huijuan, XIAO Xinyue*
(*NMPA Key Lab. for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

ABSTRACT: A pre-column derivatization HPLC method was established for the determination of other amino acids, namely aspartic acid, serine, arginine, glycine, threonine, proline, alanine, valine, methionine, cystine, isoleucine, leucine, tryptophan, isophenylalanine, histidine, lysine hydrochloride and tyrosine, in sodium glutamate. Amino acids were derivatized with 2,4-dinitrofluorobenzene. The results showed that the pre-column derivatization HPLC method had good specificity, and it was linear for above amino acids in the corresponding concentration ranges. The precision and stability of the method were good, and the average recoveries of each amino acid ranged from 90.0% to 110.0%, with the RSDs (n=9) less than 5%. The established method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the determination of other residual amino acids in sodium glutamate.

Key Words: pre-column derivatization; HPLC; amino acid; sodium glutamate; 2,4-dinitrofluorobenzene

味精是常见氨基酸——谷氨酸的钠盐，谷氨酸钠也可用作药物（药物活性成分）或药用辅料。对治疗血氨引起的肝性脑病、肝昏迷等有良好的疗效。目前谷氨酸钠在生物制品中常作为冻干保护药用辅料。多年来，美国 FDA 收到了关于食用含有味精的食物后出现头痛和恶心等症状的报告，被称为“餐厅综合征”。这些不良事件促使美国 FDA 在 20 世纪 90 年代要求独立科学团体美国实验生物学学会联合会（Federation of American Societies for Experimental Biology，FASEB）检查味精的安全性。FASEB 的报告结论是味精是安全的，该报告中确定某些敏感个体可能会出现一些短期、短暂和一般轻微的症状，例如头痛、麻木、潮红、刺痛、心悸和嗜睡，并表示以上症状可能是由其他氨基酸或杂质

#对文章贡献等同。
收稿日期：2022-06-28
作者简介：杨　锐(1978—)，男，博士，从事药用辅料的质量研究与控制。
许　凯(1993—)，男，学士，从事药用辅料的质量研究与控制。
通信作者：肖新月(1962—)，女，研究员，硕士生导师，从事药物分析及药用辅料质量控制的研究与开发。
E-mail：xiaoxy@nifdc.org.cn

导致的[1—6]。

谷氨酸钠中的其他氨基酸会影响谷氨酸钠作为原料药时的药效，存在一些安全隐患，也会影响其作为单克隆抗体类制剂的冻干保护剂时的稳定性[7]。因此，从制剂的安全性和稳定性角度考虑，需要严格控制谷氨酸钠中其他氨基酸的含量。目前，谷氨酸钠的生产工艺有 4 种，包括蛋白质水解提取法、丙烯酸合成法、废糖蜜提取法以及淀粉质原料发酵法。其中，淀粉质原料发酵法在现代工业中应用较广泛，先将淀粉质原料水解成糖液，再通过发酵手段制成谷氨酸，然后经溶液中和、分离、提取、结晶即可制成高纯谷氨酸钠[8—10]。

《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）二部和四部已收录谷氨酸钠品种，且标准中含有其他氨基酸检测方法，即茚三酮染色薄层色谱法（TLC），可用来控制其他氨基酸含量。但是，此方法的专属性和灵敏度均较低，无法真实反映谷氨酸钠中其他氨基酸的种类以及含量（如图 1 所示）。

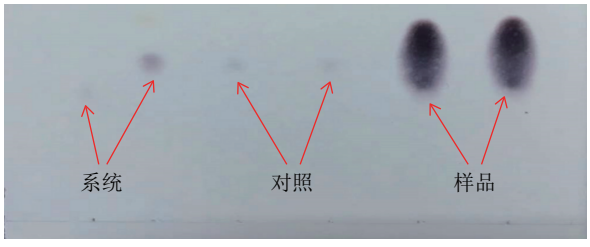


图 1 谷氨酸钠 TLC 谱图

Fig.1 TLC Pattern of Sodium Glutamate

因此，本研究建立了柱前衍生化 HPLC 法，采用 2,4- 二硝基氟苯和氨基酸的伯氨基发生桑格反应，产物氨基酸和 2,4- 二硝基苯复合物在 360 nm 紫外波长下有特异吸收[11—14]，并通过液相色谱实现各种氨基酸 -2,4- 二硝基苯复合物的分离，从而实现对其他氨基酸（天冬氨酸、丝氨酸、精氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、异苯丙氨酸、组氨酸、盐酸赖氨酸、酪氨酸）的定量分析，以期为氨基酸类冻干保护剂中其他微量氨基酸残留的检测和控制提供参考。

1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；XS205 型电子天平和 S40K 型酸度计（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

谷氨酸钠（湖南新绿方药业有限公司，批号 19102802、20031202 和 20041502）；天冬氨酸（含量 99.9 %）、谷氨酸（含量 99.9 %）、丝氨酸（含量 99.9 %）、精氨酸（含量 99.9 %）、甘氨酸（含量 99.9 %）、苏氨酸（含量 99.9%）、脯氨酸（含量 99.9%）、丙氨酸（含量 99.9%）、缬氨酸（含量 99.9 %）、甲硫氨酸（含量 99.9 %）、胱氨酸（含量 99.8%）、异亮氨酸（含量 99.9%）、亮氨酸（含量 99.9 %）、色氨酸（含量 99.9 %）、异苯丙氨酸（含量 100 %）、组氨酸（含量 99.9 %）、盐酸赖氨酸（含量 99.9%）、酪氨酸（含量 99.8%），以上对照品为成套购买，批号为 140624-201506，购于中国食品药品检定研究院；2,4- 二硝基氟苯（美国 Sigma 公司，含量 >99.0%）；二甲基甲酰胺、乙腈均为色谱纯，乙酸钠、盐酸（35%～ 38%）、硼酸、磷酸二氢钾、四硼酸钠、磷酸（≥ 84%）均为分析纯，水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 XBridge C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为 50 mmol/L 乙酸钠缓冲溶液（含 1%二甲基甲酰胺，并用乙酸调至 pH 6.8），B 为乙腈：水（50 ： 50），梯度洗脱（0—0.3 min，A 84 %；0.3—4 min，A 84%—69% ；4—9.5 min，A 69%—64 % ；9.5—17 min，A 64 %—45 % ；17—28 min，A 45%—35% ；28—34 min，A 35%—0 ；34—36 min，A 0—84 % ；36—40 min，A 84 % ）；检测波长 360 nm ；流速 1 ml/min ；柱温 27 ℃ ；进样量 20 μl。

2.2 溶液制备

衍生化溶液：精密量取 2,4- 二硝基氟苯 1.0 ml，用乙腈定容至 50 ml，密封，于 4 ℃冰箱保存。

pH 9.0 硼酸缓冲溶液（衍生化缓冲溶液）：将 0.05 mol/L 四硼酸钠溶液与 0.2 mol/L 硼酸溶液按 4 ： 1(*v*/*v*) 混合，即得。

pH 7.0 磷酸缓冲溶液（平衡缓冲溶液）：精密称取磷酸二氢钾 1.79 g，置 500 ml 量瓶中，加入

水约 300 ml 使溶解；再取 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 72.75 ml 加至量瓶中，混匀，再用水定容，即得。

对照品溶液：取 18 种氨基酸对照品各 5.0 mg，用衍生化缓冲溶液溶解，定容至 100 ml，作为对照品母液，于 4 ℃冰箱保存；移取上述溶液 5.0 ml，置 25 ml 棕色量瓶中，加入衍生化缓冲溶液 5.0 ml，混匀，再加入衍生化溶液 5.0 ml，用封口膜封口，置 60 ℃水浴中暗处反应 60 min；取出，冷却至室温，用平衡缓冲溶液定容，静置 15 min 后进样分析。

样品溶液：取谷氨酸钠样品 0.1 g，加水溶解并定容至 5 ml，取上述溶液 1 ml，移至 25 ml 棕色量瓶中，加入衍生化缓冲溶液 5.0 ml，混匀，再加入衍生化溶液 5.0 ml，用封口膜封口，置 60 ℃水浴中暗处反应 60 min；取出，冷却至室温，用平衡缓冲溶液定容，静置 15 min 后进样分析。

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验

分别量取“**2.2**”项下对照品溶液和样品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，结果见图 2 ～ 3，各氨基酸衍生物间的分离度良好。此外，按“**2.2**”项下样品溶液配制方法制备相关溶液（除不加谷氨酸钠样品外，其余步骤同样品溶液），并按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果见图 4，衍生化试剂及相关缓冲溶液对相关色谱峰的检测基本无干扰。

2.3.2　线性试验

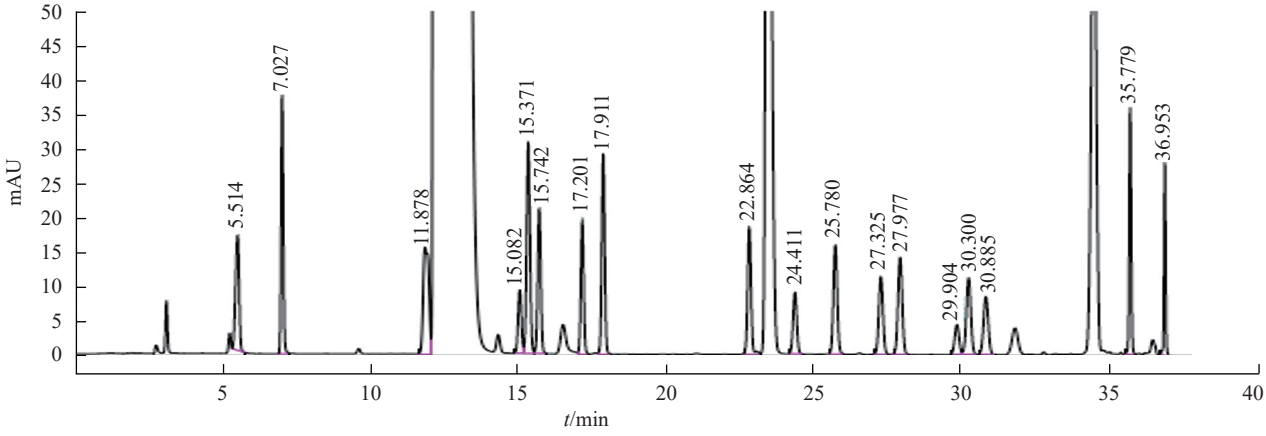
精密量取 17 种氨基酸标准品（除谷氨酸）溶液适量，分别定量稀释成 0.1、0.2、0.5、1、2、5 μg/ml 的溶液，取上述溶液各 5 ml 置 25 ml 棕色量瓶中，加入衍生化缓冲溶液 5.0 ml，混匀，再加入衍生化溶液 5.0 ml，用封口膜封口，置 60 ℃水浴中，于暗处反应 60 min；取出，冷却至室温，用平衡缓冲溶液定容，分别制成质量浓度为 0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、1 μg/ml 的线性试验溶液，静置 15 min 后，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色谱图，以峰面积（*A*）为纵坐标、质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归。结果如表 1 所示，各氨基酸在相应浓度范围内线性关系良好。

2.3.3　精密度试验

取“**2.3.2**”项下质量浓度为 1 μg/ml 的线性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，连续进样 6 次，记录色谱图，以峰面积计算 RSD。结果显示，RSD（*n*=6）均小于 2%，表明该方法精密度良好。

2.3.4　稳定性试验

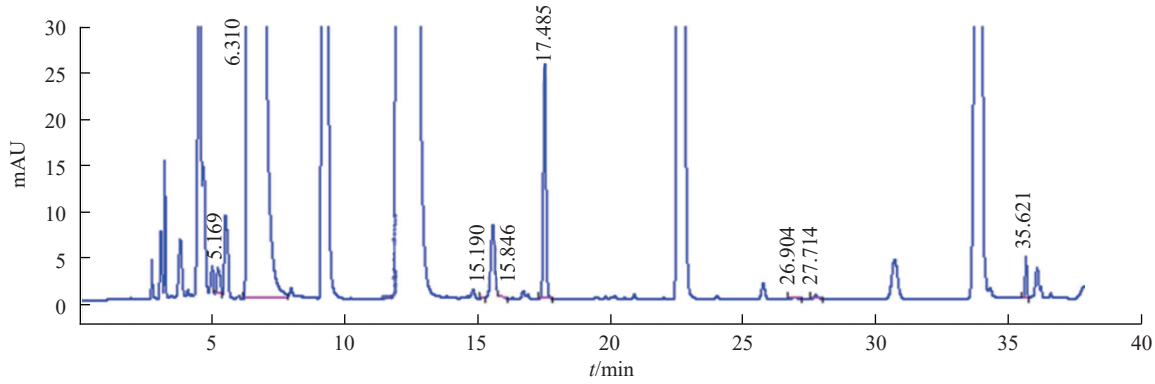
取“**2.3.2**”项下质量浓度为 1 μg/ml 的线性试验溶液，于室温（25 ℃）放置，分别于 0、24、48 h 时取样并按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，计算峰面积 RSD。结果显示，



色谱峰（有出峰时间标注）从左至右依次为天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、精氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸、异苯丙氨酸、组氨酸、盐酸赖氨酸、酪氨酸。

图 2　对照品溶液色谱图

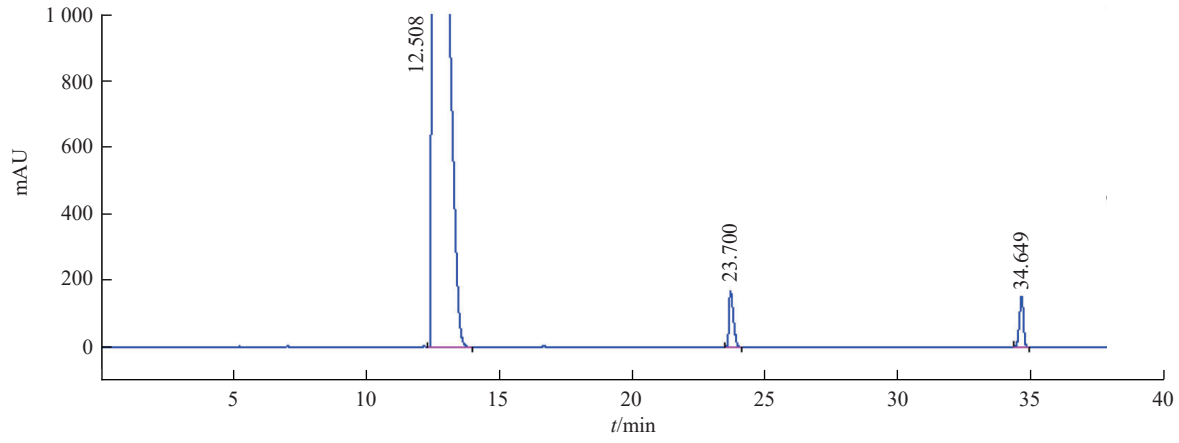
Fig.2　Chromatogram of the Reference Solution



色谱峰（有出峰时间标注）从左至右依次为天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、盐酸赖氨酸。

图 3 样品溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of the Sample Solution



色谱峰（有出峰时间标注）从左至右依次为 2,4- 二硝基苯酚、未知杂质、2,4- 二硝基氟苯。

图 4 衍生化试剂色谱图

Fig.4 Chromatogram of Derivatization Reagents

RSD（n=9）均小于 3%，表明该衍生化方法稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验

取谷氨酸钠样品（批号 20031202）0.1 g，分别加入去离子水 5 ml 使溶解，平行制备 9 份，取上述溶液各 1 ml，置 25 ml 棕色量瓶中，分别加入“**2.2**”项下质量浓度为 50 μg/ml 的对照品母液 10、20、40 μl，并加入衍生化缓冲溶液 5 ml 混匀；再加入衍生化溶液 5 ml；密闭，置 60 ℃水浴中，于暗处反应 60 min，取出并冷却至室温，最后用平衡缓冲溶液稀释并定容，静置 15 min 后进样分析，记录色谱图。将测得的峰面积带入标准曲线方程计算加样回收率和 RSD。结果显示，各氨基酸的平均回收率在均在 90.0%～ 110.0%，RSD（n=9）均小于 5%，表明该方法回收率良好。

2.3.6 检测限和定量限

取“**2.2**”项下 17 种氨基酸（除谷氨酸）的对照品溶液进行稀释，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，以信噪比为 3 ∶ 1 和 10 ∶ 1 得到各氨基酸的检测限和定量限，结果如表 1 所示。

2.4 样品测定

取 3 批谷氨酸钠样品各 0.1 g，加水溶解并定容至 5 ml，按“**2.2**”项下样品溶液制备方法制备待测样品，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，并记录色

表 1　线性试验、检测限和定量限结果

Tab.1　Results of the Linearity Test, LODs and LOQs

氨基酸	线性方程	相关系数r^2	线性范围/(μg·ml^{-1})	检测限/(ng·ml^{-1})	定量限/(ng·ml^{-1})
天冬氨酸	A=122.72c − 2.982	0.997 6	0.02～1.00	5	10
丝氨酸	A=140.35c+40.049	0.999 4	0.02～1.00	5	10
精氨酸	A=75.185c − 0.593 6	0.999 7	0.02～1.00	5	10
甘氨酸	A=229.46c − 1.342 8	0.999 8	0.02～1.00	5	10
苏氨酸	A=148.83c − 1.044 9	0.999 7	0.02～1.00	5	10
脯氨酸	A=117.35c − 1.246	0.999 4	0.02～1.00	5	10
丙氨酸	A=200.73c − 1.597 7	0.999 7	0.02～1.00	5	10
缬氨酸	A=158.32c − 1.195	0.999 4	0.02～1.00	5	10
甲硫氨酸	A=114.41c − 5.647 1	0.998 6	0.05～0.50	10	20
胱氨酸	A=126.67c − 0.876 4	0.999 5	0.02～1.00	5	10
异亮氨酸	A=116.95c − 0.214	0.999 8	0.02～1.00	5	10
亮氨酸	A=133.18c − 0.506 5	0.999 8	0.02～1.00	5	10
色氨酸	A=46.234c − 0.512 4	0.999 4	0.02～1.00	10	20
异苯丙氨酸	A=109.07c − 0.620 6	0.999 8	0.02～1.00	5	10
组氨酸	A=98.414c − 1.016 2	0.996 4	0.02～1.00	5	10
盐酸赖氨酸	A=172.5c − 1.262 5	0.999 7	0.02～1.00	5	10
酪氨酸	A=102.71c − 0.714 4	0.999 6	0.02～1.00	5	10

谱图，将测得的峰面积代入标准曲线计算各氨基酸的含量。结果如表 2 所示，均符合 ChP 2020 谷氨酸钠标准中关于其他氨基酸总量的规定（≤0.5%）。

表 2　样品测定结果 /(μg·g^{-1})

Tab.2　Determination Results of the Samples/(μg·g^{-1})

氨基酸	氨基酸含量		
	批号19102802	批号20031202	批号20041502
天冬氨酸	75.4	82.3	93.0
甘氨酸	7.7	5.9	6.4
苏氨酸	8.2	7.9	6.6
丙氨酸	167.1	187.8	167.2
亮氨酸	5.2	未检出	未检出
盐酸赖氨酸	8.9	7.1	7.7

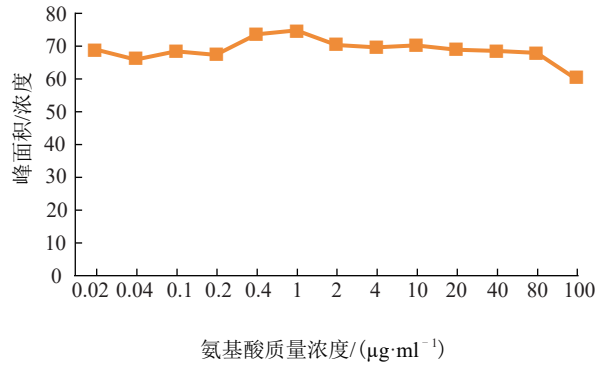


图 5　衍生化试剂的量对氨基酸衍生的影响

Fig.5　Effect of Amount of the Derivatization Reagent on Amino Acid Derivatization

3　讨论

3.1　衍生化试剂的量对氨基酸衍生化试验的影响

配制 0.02、0.04、0.1、0.2、0.4、1、2、4、10、20、40、80、100 μg/ml 的系列质量浓度氨基酸对照品溶液，并按“**2.2**”项下对照品溶液制备方法，均加入 0.172 mol/L 的衍生化试剂 5 ml 制备待测溶液，记录氨基酸衍生物色谱峰峰面积与相应质量浓度的比值。结果如图 5 所示。以精氨酸计，在氨基酸最终浓度值为 80 μg/ml 时，精氨酸峰面积和浓度比基本不变，说明衍生化试剂量足够，氨基酸可完全反应；但在氨基酸最终浓度值为 100 μg/ml 时，精氨酸峰面积和浓度比值减小，衍生化试剂量不够，氨基酸未能完全反应，即衍生化试剂和氨基酸质量浓度比大于 3 ∶ 1 时，氨基酸均能完全衍生化。

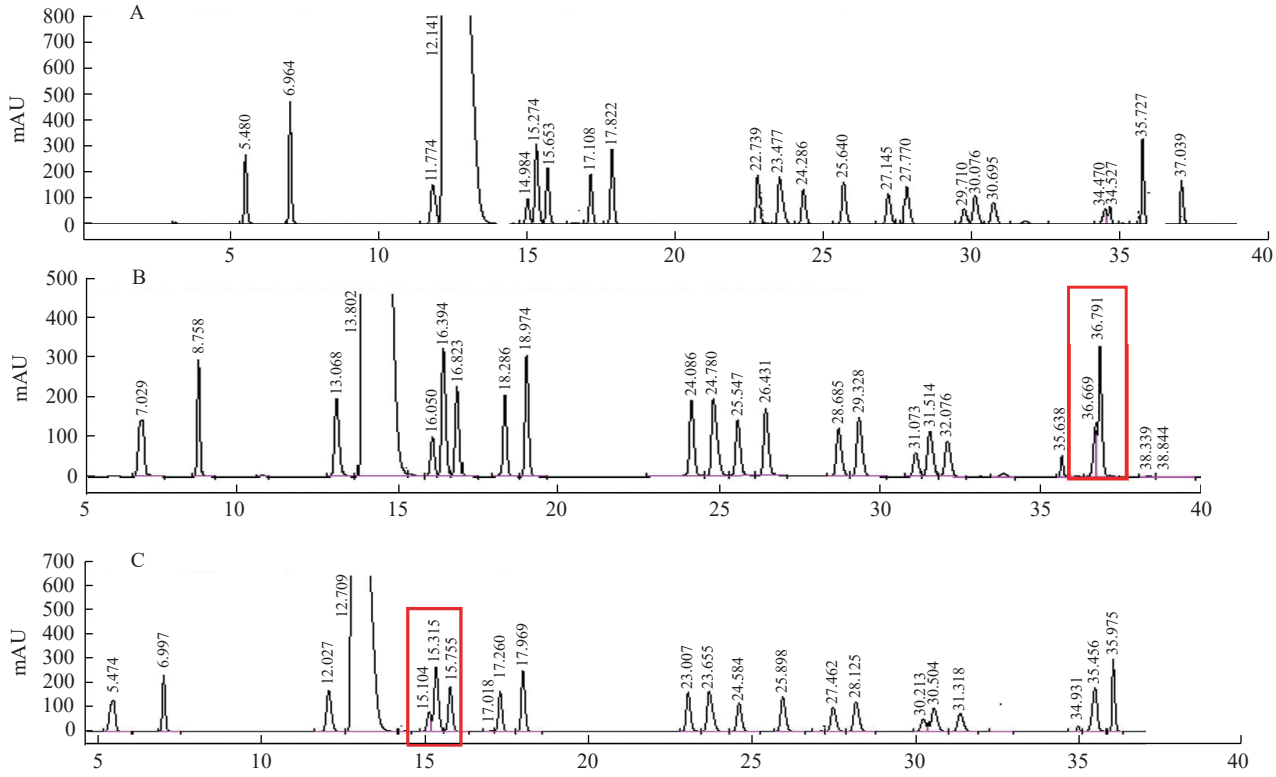
3.2　流动相 pH 值对分离度的影响

选取不同 pH 值的流动相 A 进行氨基酸衍生化后分析试验。结果如图 6 所示，pH 值较低会影响盐酸赖氨酸、酪氨酸的分离度以及信号响应；pH 值较高会影响精氨酸、甘氨酸、苏氨酸的分离；pH 6.8 时能使色谱峰较好分离并兼顾酪氨酸的信号响应。

3.3　不同基质键合相的 C_{18} 柱进行色谱柱对分离度的影响

分别选取了以传统的硅胶为键合相的、耐受 pH 范围为 2 ～ 12 的 C_{18} 柱和以杂化颗粒为键合相

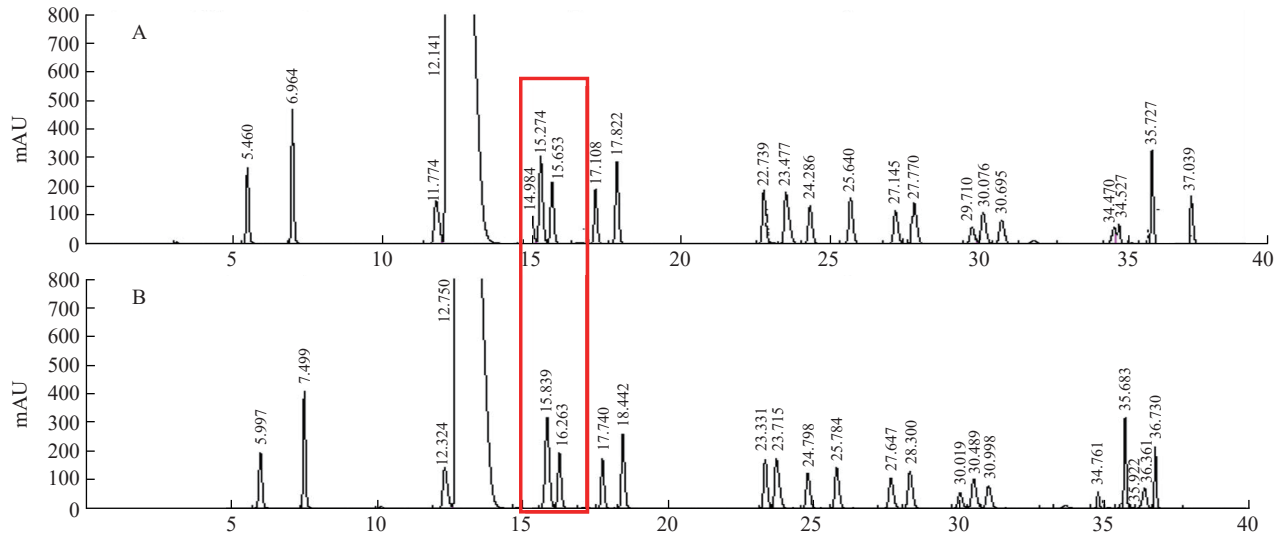
的、耐受 pH 范围相同的 C_{18} 柱，其余按“**2.1**”项下色谱条件进行试验。结果如图 7 所示，以传统的硅胶为键合相的 C_{18} 柱分离度较差，且耐用性较低；而以杂化颗粒为键合相的 C_{18} 柱，分离度相对较好，



A—pH 6.8；B—pH 6.0；C—pH 7.0。

图 6　不同 pH 条件下的对照品图谱

Fig.6　Chromatograms of the Reference Substances under Different pH Conditions



A—杂化颗粒键合的 C_{18} 柱；B—普通硅胶键合的 C_{18} 柱。

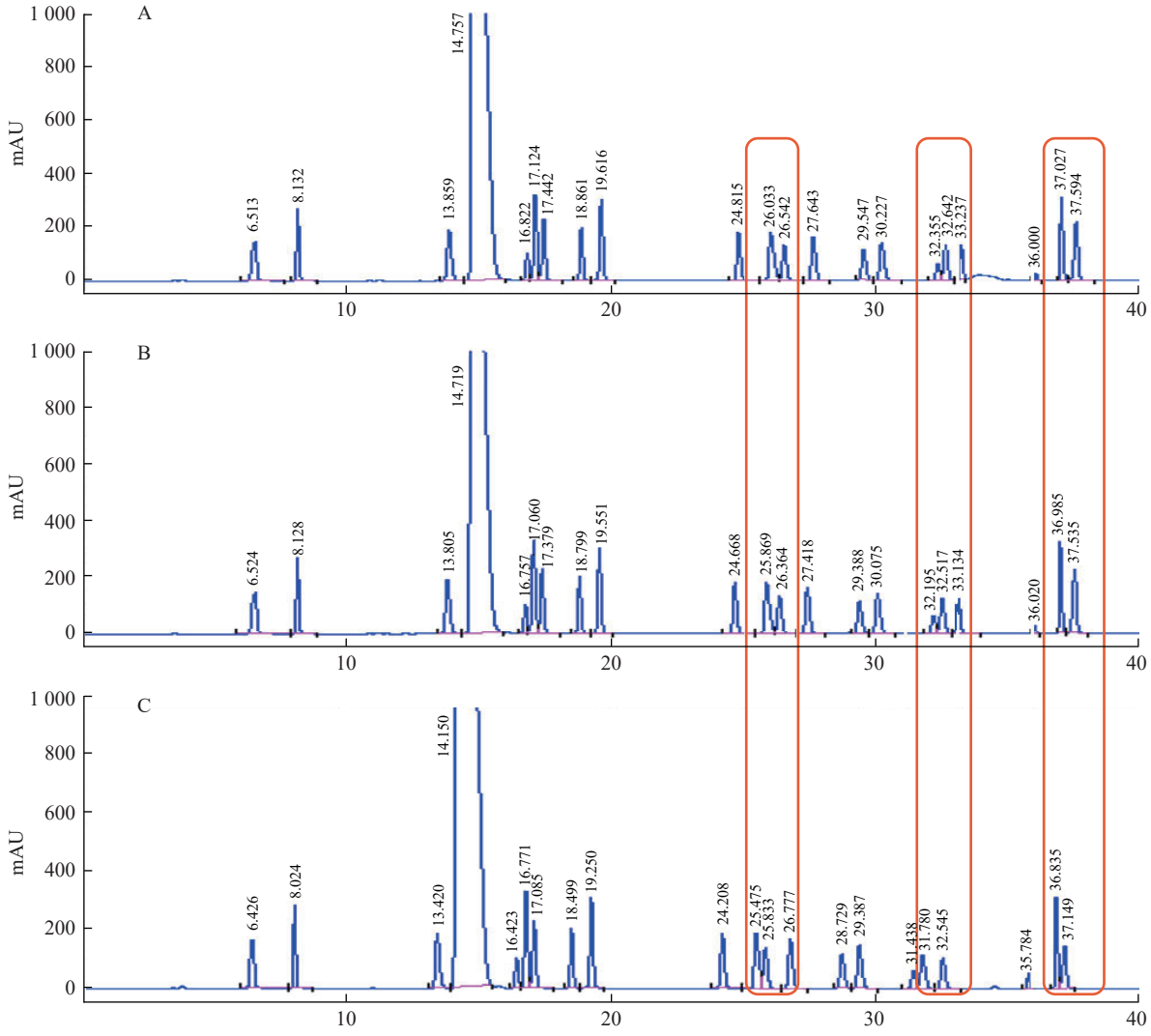
图 7　不同色谱柱条件下的对照品图谱

Fig.7　Chromatograms of the Reference Substances under Different Chromatographic Column Conditions

且色谱柱耐用性较高。由于高盐类混合物对色谱柱损害也较大，为此，建议使用耐用性较高的 C_{18} 键合硅胶柱。

3.4　色谱柱温度对分离度的影响

选取 3 种不同柱温（25、27、30 ℃），其余按“**2.1**”项下色谱条件进行氨基酸衍生化后分析试验。结果如图 8 所示，随着柱温的升高，色谱柱和氨基酸衍生物的作用力减弱，导致氨基酸衍生物的色谱保留时间变短；但温度对不同的氨基酸衍生物影响效果不同，从图 8 可知随着温度的升高，甲硫氨酸和衍生化试剂的分离度以及盐酸赖氨酸和酪氨酸的分离度变差，但色氨酸和异苯丙氨酸的分离效果变好。因此综合考虑各色谱峰的分离度，选取柱温为 27 ℃进行试验。



A—柱温 25 ℃；B—柱温 27 ℃；C—柱温 30 ℃。

图 8　不同色谱柱温度条件下的对照品图谱

Fig.8　Chromatograms of the Reference Substances at Different Column Temperatures

参考文献：

[1] WALKER R, LUPIEN J R. The safety evaluation of monosodium glutamate [J]. *J Nutr*, 2000, **130**(4S Suppl): 1049S-1052S.

[2] BUNYAN J, MURRELL E A, SHAH P P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate [J]. *Br J Nutr*, 1976, **35**(1): 25-39.

[3] KOBAYASHI K, YATSUKAWA Y, TANAKA M, *et al*. Establishment of a method for determining the origin of glutamic acid in processed food based on carbon and nitrogen stable isotope ratios [J]. *Heliyon*, 2019, **5**: e01169.

[4] OLNEY J W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, **164**(3880): 719-721.

[5] OLNEY J W, SHARPE L G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, **166**(3903): 386-388.

[6] BELLISLE F, MONNEUSE M O, CHABERT M, *et al*. Monosodium glutamate as a palatability enhancer in the European diet [J]. *Physiol Behav*, 1991, **49**(5): 869-873.

[7] 陈 燕, 陆志刚, 白 海. 不同冻干保护体系对海藻糖负载红细胞冻干保存影响的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, **21**(3): 775-779.

[8] 黄俊生, 邱晨晨, 陈耿廷. 余甘子固态调味品生产工艺研究[J]. 中国调味品, 2017, **42**(12): 111-114.

[9] 黄毅梅, 邓 丰, 李 静. 我国味精行业清洁生产技术的应用[J]. 广东轻工职业技术学院学报, 2015, **14**(2): 14-18.

[10] XUE F Y, MIAO J X, ZHANG X, *et al*. Studies on lipid production by Rhodotorula glutinis fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99**(13): 5923-5927.

[11] RYOKO T, KENICHIRO T, KAZUYUKI M, *et al*. Assessment of the efficacy of anticancer drugs by amino acid metabolomics using fluorescence derivatization-HPLC [J]. *Anal Sci*, 2014, **30**(7): 751-758.

[12] FU J Y, WANG Z Y, LUO W, *et al*. Novel sanger's reagent-like styrene polymer for the immobilization of burkholderia cepacia lipase [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(37): 30973-30982.

[13] FIDA M, KHALIL S, SALEH O A, *et al*. Diagnostic value of 16S ribosomal RNA gene polymerase chain reaction/sanger sequencing in clinical practice [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, **73**(6): 961-968.

[14] 朱彭龄. 磷酸三乙胺-乙腈流动相体系反相分离2,4-二硝基氟苯-氨基酸衍生物[J]. 分析测试技术与仪器, 2012, **18**(1): 1-13.