

利那洛肽与醋酸奥曲肽中氨基酸的分析方法

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

本实验使用Durashell AA氨基酸分析方法包, 以OPA和FMOC为衍生试剂采用自动化柱前衍生的方式对酸水解后的多肽样品中的氨基酸进行测试。

关键词

多肽; 氨基酸; Durashell AA氨基酸分析方法包。

化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	英文缩写	CAS号	分子式	分子量
天冬氨酸	Asp	56-84-8	C ₄ H ₇ NO ₄	133.1
谷氨酸	Glu	56-86-0	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13
丝氨酸	Ser	56-45-1	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09
甘氨酸	Gly	56-40-6	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07
组氨酸	His	71-00-1	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.15
精氨酸	Arg	74-79-3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2
苏氨酸	Thr	72-19-5	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12
丙氨酸	Ala	56-41-7	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09
脯氨酸	Pro	147-85-3	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13
酪氨酸	Tyr	60-18-4	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.19
缬氨酸	Val	72-18-4	C ₆ H ₁₁ NO ₂	117.15
甲硫氨酸	Met	63-68-3	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21
异亮氨酸	Ile	73-32-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17
亮氨酸	Leu	61-90-5	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.17
苯丙氨酸	Phe	63-91-2	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19
赖氨酸	Lys	56-87-1	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19
胱氨酸	Cys-Cys	56-89-3	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	240.3
色氨酸	Trp	54-12-6	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.22
正缬氨酸	Nva	2013-12-9	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15
肌氨酸	Sar	107-97-1	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09

实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

Agilent 1100高效液相色谱仪, DAD检测器

3.1.2 试剂材料

实验用水为屈臣氏蒸馏水。

甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯试剂。

盐酸、0.1mol/L盐酸、十二水合磷酸氢二钠、十水合四硼酸钠为分析纯试剂。

混合氨基酸标准溶液: 含17种氨基酸, 其中L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸浓度为2.5 μmol/mL, L-胱氨酸浓度为1.25 μmol/mL。

3, 3-二硫代二丙酸溶液: 取二硫代二丙酸, 加0.2 mol/L氢氧化钠溶液溶解制成每1.0 mL中约含20 mg的溶液。

内标溶液: 含正缬氨酸和肌氨酸的溶液。

OPA衍生试剂B液: 80 μL/mL的3-巯基丙酸溶液, 使用硼酸盐缓冲液溶解;

OPA衍生试剂: 取Durashell AA氨基酸分析方法包中的OPA衍生试剂A液1支, 加入OPA衍生试剂B液60 μL, 混匀, 既得。

稀释剂: 取水100mL, 加磷酸0.5mL, 混匀。

50%乙腈溶液: 取乙腈50mL, 加水50mL, 混匀。

流动相A: 称取十二水合磷酸氢二钠9.0g, 十水合四硼酸钠9.5g, 加水2000mL, 用盐酸调节pH至8.2;

流动相B: 量取甲醇450mL, 乙腈450mL, 水100mL, 混匀, 超声脱气。



3.1.3 多肽样品酸水解方法：

称取多肽样品，加0.1 mol/L盐酸溶解并稀释制成每1.0 mL中含2.0 mg的溶液，移取样品溶液50μL、内标溶液50 μL，置10 mL玻璃样品瓶中，于50 °C下氮吹至干，加入3，3-二硫代二丙酸溶液200 μL，异丙醇100 μL，于50 °C下氮吹至干，向残渣中加入6 mol/L盐酸溶液（含0.1%苯酚）1.0 mL，摇匀，充氮3 min后密封，置110 °C下水解24小时或150 °C水解1.5小时。取出冷却至室温。

混合氨基酸对照品溶液：量取Durashell AA氨基酸分析方法包中的混合氨基酸标准溶液100 μL，内标溶液50 μL，置10 mL样品瓶中，于50 °C下氮吹至干，加入3，3-二硫代二丙酸溶液200 μL，异丙醇100 μL，于50 °C下氮吹至干。向残渣中加入6 mol/L盐酸溶液（含0.1%苯酚）1.0 mL，摇匀，充氮3 min后密封，置110 °C下水解24小时。或150 °C水解1.5小时。取出冷却至室温。

衍生用多肽样品和氨基酸混合对照溶液：将酸水解后的多肽溶液和氨基酸混合对照溶液于50°C下氮吹至干，向残渣中加入 0.1 mol/L盐酸0.5 mL，超声溶解，摇匀，经0.22 μm尼龙滤膜过滤，取续滤液待测。

3.2仪器检测条件

色谱柱：Durashell 3μm AA，4.6×150mm；
柱 温：45 °C；
波 长：338nm，带宽10nm；参比波长：390nm，带宽20nm；（一级氨基酸）；262nm，带宽16nm，参比波长：324nm，带宽8nm；（二级氨基酸）；
狭缝：4nm，峰宽 > 0.03min；

表2.梯度洗脱程序

时间/min	流动相A%	流动相B%	流速mL/min
0	94	6	1.6
6	90	10	1.6
8	90	10	1.6
10	84	16	1.3
23	60	40	1.0
30	50	50	1.6
31	0	100	1.6
34	0	100	1.6
35	94	6	1.6
38	94	6	1.6

安捷伦进样器自动衍生程序：

序号	进样器程序	衍生用试剂的分装与放置位置
1	从1号瓶中吸取硼酸盐缓冲液5 μL	往2mL进样瓶中加入1mL硼酸盐缓冲液，加带密封垫的螺旋盖，密封，置于进样器样品架的1号位置
2	从样品瓶中吸取样品2 μL	衍生用氨基酸标准溶液及样品溶液置于进样器样品架的8-100号位置
3	在空气中以最大的速度混合7μL，6次	
4	等待0.5分钟	
5	从2号瓶中吸取水0μL	向2mL样品瓶中加入2mL水，加不带密封垫的螺旋盖，置于进样器样品架的2号位置
6	从3号瓶中吸取OPA衍生剂1μL	向带内插管的棕色样品瓶中加入200μL OPA衍生试剂，加带密封垫的螺旋盖，密封，置于进样器样品架的3号位置
7	在空气中以最大的速度混合8μL，6次	
8	从6号瓶中吸取水0μL	向2mL样品瓶中加入2mL水，加不带密封垫的螺旋盖，置于进样器样品架的6号位置
9	从4号瓶中吸取FMOC衍生剂1μL	向带内插管的棕色样品瓶中加入200μL FMOC衍生试剂，加带密封垫的螺旋盖，密封，置于进样器样品架的4号位置
10	在空气中以最大的速度混合9μL，10次	
11	从7号瓶中吸取50%乙腈溶液0μL	向2mL样品瓶中加入50%乙腈溶液2mL，加不带密封垫的螺旋盖，置于进样器样品架的7号位置
12	从5号瓶中吸取稀释剂32μL	向2mL样品瓶中加入稀释剂2mL，加带密封垫的螺旋盖，密封，置于进样器样品架的5号位置
13	在空气中以最大的速度混合41μL，8次	
14	进样	

辅助：吸液速度：200 μL/min；
喷液速度：600 μL/min
吸液位置：0.0mm

3.3多肽水解液测试结果

表3.混合氨基酸对照溶液峰面积

氨基酸名称	英文缩写	保留时间/min	水解条件	
			110 °C	150 °C
门冬氨酸	Asp	1.269	193.5	195.4
谷氨酸	Glu	1.695	205.9	211.3
丝氨酸	Ser	4.989	191.7	208.7
组氨酸	His	6.885	120.5	126.4
甘氨酸	Gly	7.814	220.1	228.4
苏氨酸	Thr	8.546	194.8	211.8
半胱氨酸	Cys-X	9.613	165.3	189.6
精氨酸	Arg	11.563	262.8	276.1
丙氨酸	Ala	12.775	276	289.2
酪氨酸	Tyr	15.633	265.8	275.5
缬氨酸	Val	19.574	314	320.9
甲硫氨酸	Met	19.918	303.9	332.8
正缬氨酸	Nva (内标)	20.695	277.4	299.5
苯丙氨酸	Phe	22.470	319.4	336.5
异亮氨酸	Ile	22.966	315	332.8
亮氨酸	Leu	24.202	336.3	319.3
赖氨酸	Lys	24.703	495.1	425
肌氨酸	Sar (内标)	29.484	293.1	316.3
脯氨酸	Pro	30.518	200.7	213.9

表4.利那洛肽样品溶液110℃下水解测试数据

氨基酸名称	英文缩写	峰面积	氨基酸比值	
			测试值	要求范围
门冬氨酸	Asp	53.4	1.06	0.85-1.15
谷氨酸	Glu	53.7	1.00	0.85-1.15
甘氨酸	Gly	57.6	1.00	0.85-1.15
苏氨酸	Thr	50.3	0.99	0.85-1.15
半胱氨酸	Cys-X	252.6	5.85	5.1-6.9
丙氨酸	Ala	67.9	0.94	0.85-1.15
酪氨酸	Tyr	115.5	1.66	1.7-2.3
正缬氨酸	Nva (内标)	274.1		
肌氨酸	Sar (内标)	268.7		
脯氨酸	Pro	50	0.95	0.85-1.15

表5.利那洛肽样品溶液150℃下水解测试数据

氨基酸名称	英文缩写	峰面积	氨基酸比值	
			测试值	要求范围
门冬氨酸	Asp	53.9	1.02	0.85-1.15
谷氨酸	Glu	52.5	0.98	0.85-1.15
甘氨酸	Gly	57.7	1.00	0.85-1.15
苏氨酸	Thr	52.8	0.98	0.85-1.15
半胱氨酸	Cys-X	306.3	6.28	5.1-6.9
丙氨酸	Ala	73.9	0.99	0.85-1.15
酪氨酸	Tyr	127.6	1.89	1.7-2.3
正缬氨酸	Nva (内标)	295.2		
肌氨酸	Sar (内标)	312.2		
脯氨酸	Pro	58.6	1.07	0.85-1.15

表6.醋酸奥曲肽样品溶液110℃下水解测试数据

氨基酸名称	英文缩写	峰面积	氨基酸比值	
			测试值	要求范围
苏氨酸	Thr	76.4	0.99	0.8-1.2
半胱氨酸	Cys-X	130.6	2.00	1.7-2.3
正缬氨酸	Nva (内标)	273.4		
苯丙氨酸	Phe	244	1.93	1.8-2.2
赖氨酸	Lys	208.5	1.07	0.9-1.1

表7.醋酸奥曲肽样品溶液150℃下水解测试数据

氨基酸名称	英文缩写	峰面积	氨基酸比值	
			测试值	要求范围
苏氨酸	Thr	65	1.00	0.8-1.2
半胱氨酸	Cys-X	122.8	2.11	1.7-2.3
正缬氨酸	Nva (内标)	287.7		
苯丙氨酸	Phe	195.0	1.89	1.8-2.2
赖氨酸	Lys	144.7	1.11	0.9-1.1

3.4实验谱图

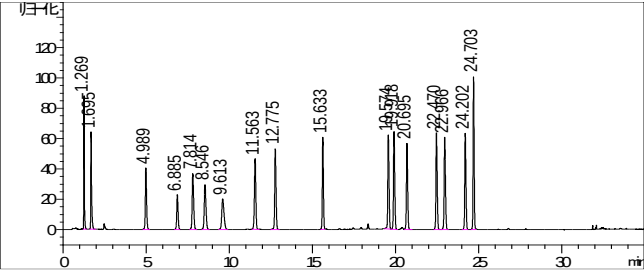


图1. 混合氨基酸对照溶液色谱图(一级氨基酸)

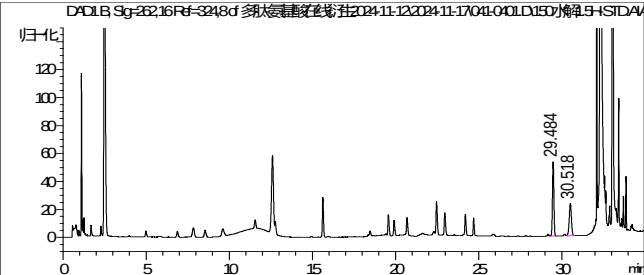


图2. 混合氨基酸对照溶液色谱图(二级氨基酸)

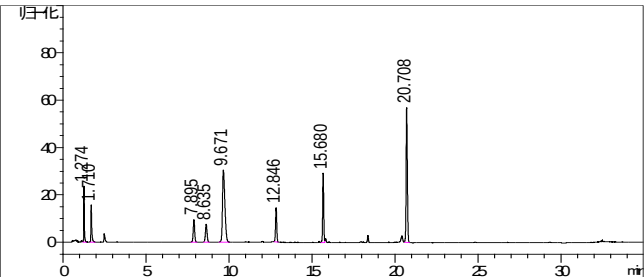


图3. 利那洛肽样品溶液色谱图(一级氨基酸)

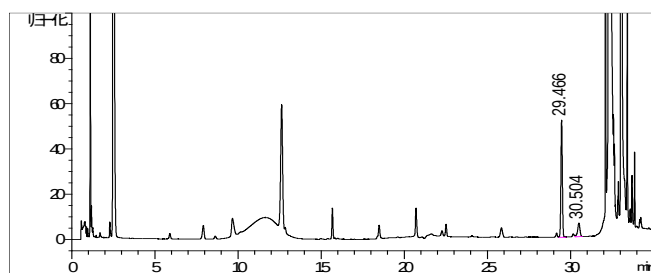


图4. 利那洛肽样品溶液色谱图(二级氨基酸)

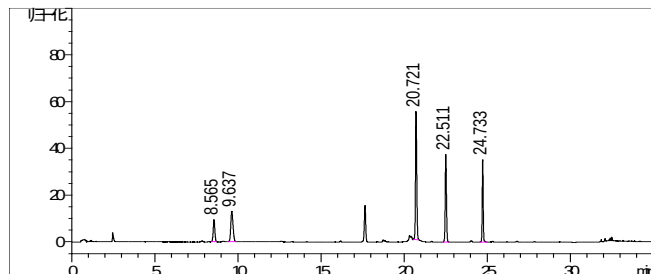


图5. 醋酸奥曲肽样品溶液色谱图(一级氨基酸)

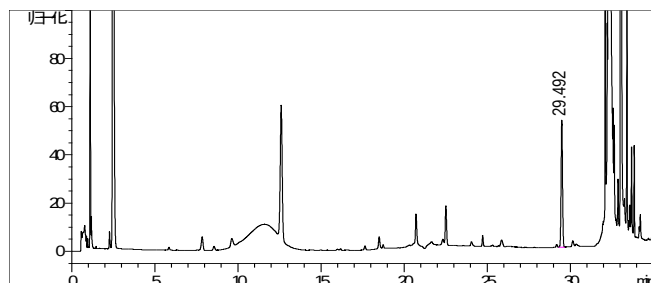


图6. 醋酸奥曲肽样品溶液色谱图(二级氨基酸)

结果表明，利那洛肽经酸性水解后进行各氨基酸比值分析与理论值相符，该方法可作为多肽类药物水解后经衍生检测氨基酸比值的手段，同时，建议根据不同多肽氨基酸组成优化水解温度、时长及巯基保护试剂以获得更好结果。

订购信息：

Durashell 氨基酸分析方法试剂包中，含有以下各组件：

货号	产品名称	产品描述	数量
DAA-Kit	Durashell 氨基酸分析方法试剂包	包含 DAA-P*1, DAA-OA*4, DAA-OB*2, DAA-F*4, DAA-SS17*2, DAA-SS02*1	
DAA-P	DAA 缓冲液	硼酸缓冲液, 10 mL/瓶	1瓶
DAA-OA	DAA OPA 衍生试剂A液	邻苯二甲醛, 0.6 mL/瓶	4瓶
DAA-OB	DAA OPA 衍生试剂B液	3-巯基丙酸, 0.3 mL/瓶	2瓶
DAA-F	DAA FMOC 衍生试剂	氯甲酸-9-苄基甲酯, 0.6mL/瓶	4瓶
DAA-SS17	DAA 氨基酸标准溶液 (含 17 种氨基酸)	L-门冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-精氨酸、L-苏氨酸、L-丙氨酸、L-脯氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸、L-赖氨酸浓度为 2.5 $\mu\text{mol/mL}$, L-胱氨酸浓度为 1.25 $\mu\text{mol/mL}$, 溶于 0.1 mol/L HCl 溶液, 1 mL/瓶	2瓶

DAA-SS02	DAA 氨基酸标准溶液 (含 2 种氨基酸)	正缬氨酸, 肌氨酸浓度为 0.5 mg/mL, 溶于 0.1 mol/L HCl 溶液, 10 mL/瓶	
----------	------------------------	--	--

可选试剂：

货号	产品名称	产品描述
DAA-SS01-Trp	DAA 氨基酸标准溶液-Trp	色氨酸, 100 mg
DAA-SS01-Hyp	DAA 氨基酸标准溶液-Hyp	羟脯氨酸, 100 mg





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息,
请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

