

测试报告

样品信息			
样品名称	多肽水解氨基酸测定	编号	W20140504-001
样品重量	\	剂型	\
收样日期	2014/05/04	测试期间	2014/05/04-05/08
样品描述			
测试需求			
测试成分	含测		
参考标准			
参考标准	高效液相色谱法	标样	有
仪器信息			
测试仪器	高效液相色谱仪	仪器型号	安捷伦 1260

● 色谱条件:

色谱柱:	月旭 Amino Acid, 4.6×250mm, 5μm
流动相:	流动相 A: 0.1mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6.5): 乙腈=93: 7 流动相 B: 水: 乙腈=20: 80
检测波长:	254 nm
柱温:	40℃
流速:	1 ml/min
进样量:	2.5 μl
注意事项:	

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

邮编: 321000

E-mail: Houzisheng@welchmat.com

● 流动相配置:

流动相 A: 0.1mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6.5): 乙腈=93.0: 7.0

配制方法: 准确称取三水合醋酸钠 13.6g 于 1000ml 水中, 搅拌均匀, 使之溶解, 用冰醋酸或氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.50; 准确量取配制好的三水合醋酸钠溶液 930ml 和乙腈 70ml, 混合均匀, 抽滤过 0.45 μ m 滤膜;

流动相 B: 水: 乙腈=20.0: 80.0

配制方法: 准确量取水 200ml 和乙腈 800ml, 混合均匀, 抽滤过 0.45 μ m 滤膜;

梯度程序:

T(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.01	100.0	0.0
11	93.0	7.0
13.9	88.0	12.0
14	85.0	15.0
29	67.0	33.0
32	30.0	70.0
35	0.0	100.0
42	0.0	100.0
45	100.0	0.0
60	100.0	0.0

● 溶液配制:

- 1) 0.1mol/L 盐酸溶液: 量取 9.0mL 浓盐酸, 加去离子水稀释至 1000mL。
- 2) 正亮氨酸内标溶液: 称取正亮氨酸约 10.08mg, 加 0.1mol/L 盐酸溶液 10mL 溶解, 混匀。
- 3) 6mol/L 盐酸溶液配制: 取浓盐酸 10mL 和水 10mL 溶解, 混匀。
- 4) 混合氨基酸标准溶液 (标液氨基酸浓度见表一): 准确取氨基酸标准溶液 1.0mL, 置于 10mL 容量瓶中, 加水定容至刻度。(该溶液在 4 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月, 在 -20 $^{\circ}$ C 下可保存 6 个月)。
- 5) 衍生试剂配制: 分别取 A, B 两种衍生试剂用稀释剂稀释各稀释 5 倍, 混匀。

声明:除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

邮编: 321000

E-mail: Houzisheng@welchmat.com

● 样品溶液配制:

1、对照品溶液的制备

表一 17种氨基酸对照品溶液稀释 10 倍后的浓度为

Name	M. W.	标准值 C(mmol/L)	浓度 C(mg/mL)	Name	M. W.	标准值 C(mmol/L)	浓度 C(mg/mL)
门冬氨酸	133.10	0.25	0.03328	氯化铵	53.49	0.25	0.01337
谷氨酸	147.13	0.25	0.03678	酪氨酸	181.19	0.25	0.04530
丝氨酸	105.09	0.25	0.02627	缬氨酸	117.15	0.25	0.02929
甘氨酸	75.067	0.25	0.01877	蛋氨酸	149.21	0.25	0.03730
组氨酸	155.15	0.25	0.03879	异亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
精氨酸	174.20	0.25	0.04355	亮氨酸	131.17	0.25	0.03279
苏氨酸	119.12	0.25	0.02978	苯丙氨酸	165.19	0.25	0.04130
丙氨酸	89.093	0.25	0.02227	赖氨酸	146.19	0.25	0.03655
脯氨酸	115.13	0.25	0.02878				

2、供试品溶液制备

酸水解法:

准确称取样品 1.92 mg, 置于 50mL 碘量瓶中, 加入 10mL 的 6mol/L 盐酸, 振摇使样品溶解或使样品均匀分散于溶液中, 密封, 然后置 $110 \pm 1^\circ\text{C}$ 加热回流水解 24 小时, 取出冷却, 打开碘量瓶, 将水解液全部转移到 50mL 容量瓶内, 用超纯水定容至刻度, 混匀, 精密量取 40ml 溶液用蒸发皿中挥干, 再量取 4ml 超纯水分两次润洗, 混合溶液供衍生使用。

3、氨基酸标准溶液和样品溶液的衍生

氨基酸样品溶液: 准确量取样品溶液 1ml, 置于试管中, 准确加入 $50 \mu\text{l}$ 正亮氨酸内标溶液, 混匀, 再加入稀释后的 A 溶液 0.5ml 和稀释后的 B 溶液 0.5ml, 摇匀; 在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中加热 45 分钟, 取出, 加入正己烷溶液 1ml 振摇, 室温放置 30 分钟后, 取澄清的下层液用 $0.45 \mu\text{m}$ 小滤器过滤。

氨基酸标准溶液: 精密量取上述对照品溶液 1ml, 置于试管中, 准确加入 $50 \mu\text{l}$ 正亮氨酸内标溶液, 再加入稀释后的 A 溶液 0.5ml 和稀释后的 B 溶液 0.5ml, 摇匀; 在 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴中加热 45 分钟, 取出, 加入正己烷溶液 1ml 振摇, 室温放置 30 分钟后, 取澄清的下层液用 $0.45 \mu\text{m}$ 小滤器过滤。

● 谱图和数据:

声明:除非另有说明, 此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可, 不可复制。

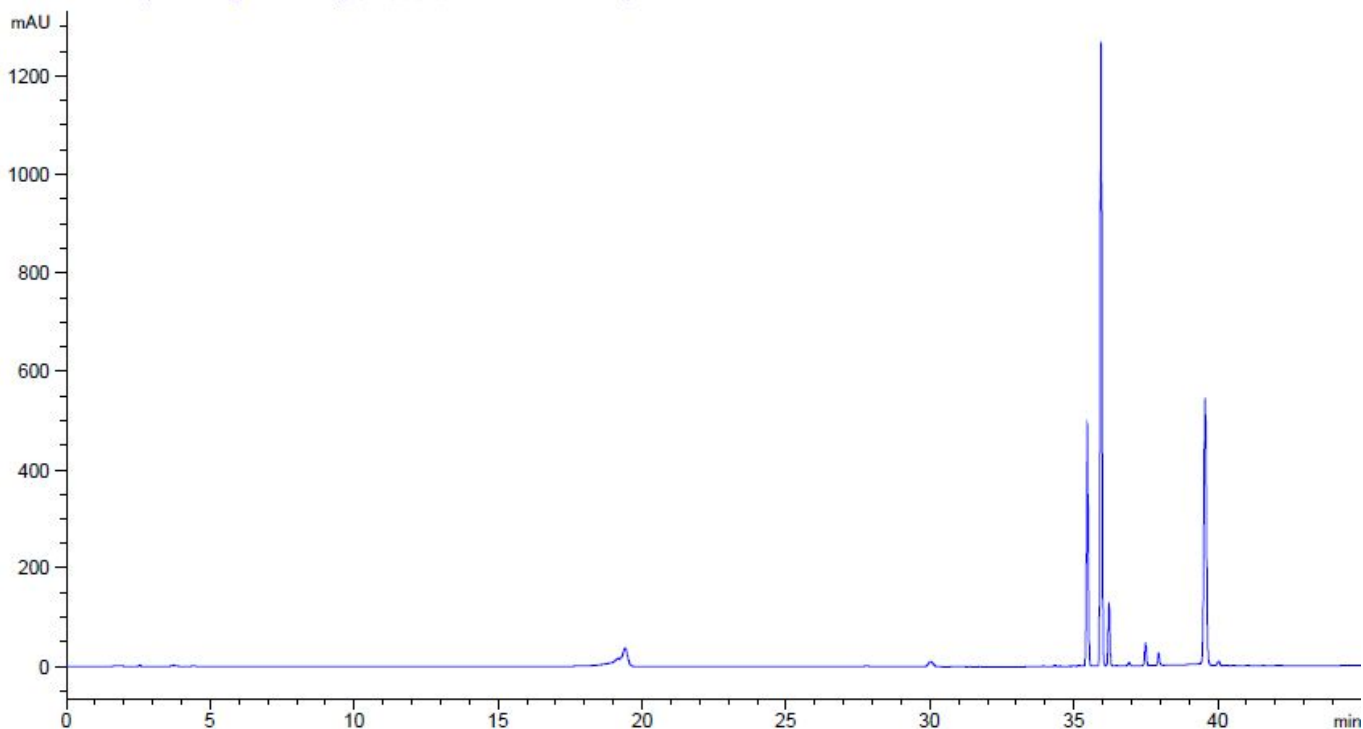
Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

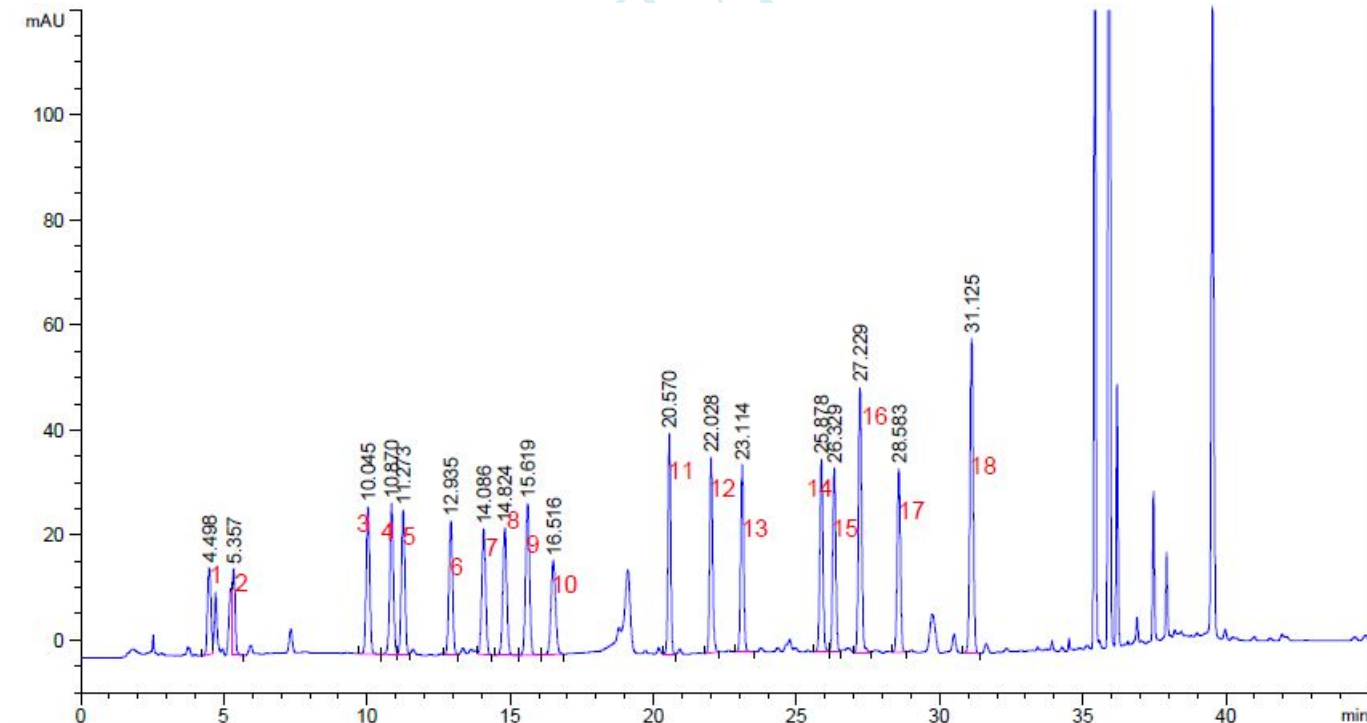
邮编: 321000

E-mail: Houqizhong@welchmat.com

1、氨基酸空白



2、氨基酸标准品



声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

邮编: 321000

E-mail: Houcisheng@welchmat.com

1.	门冬氨酸	10.	氯化铵
2.	谷氨酸	11.	酪氨酸
3.	丝氨酸	12.	缬氨酸
4.	甘氨酸	13.	蛋氨酸
5.	组氨酸	14.	异亮氨酸
6.	精氨酸	15.	亮氨酸
7.	苏氨酸	16.	正亮氨酸
8.	丙氨酸	17.	苯丙氨酸
9.	脯氨酸	18.	赖氨酸

保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
4.498	-	139.13170	16.58064	0.94	0.1961	2913	-	-
5.357	-	123.85720	16.46502	1.01	0.1297	9453	3.10	1.19
10.045	-	234.91226	28.05652	0.99	0.1267	34829	21.49	1.88
10.870	-	249.29388	28.68704	1.02	0.1311	38079	3.76	1.08
11.273	-	234.23065	27.59657	1.01	0.1289	42382	1.82	1.04
12.935	-	225.62219	25.50801	1.01	0.1367	49640	7.36	1.15
14.086	-	223.51280	23.83449	0.99	0.1444	52690	4.81	1.09
14.824	-	233.99724	24.18274	0.99	0.1483	55325	2.96	1.05
15.619	-	273.11432	28.91637	1.01	0.1450	64289	3.18	1.05
16.516	-	198.60670	17.81440	0.97	0.1700	52295	3.35	1.06
20.570	-	267.77139	41.89854	0.98	0.0978	245187	17.79	1.25
22.028	-	264.58786	37.05740	0.91	0.1067	236238	8.38	1.07
23.114	-	258.43695	35.49837	0.97	0.1111	239729	5.86	1.05
25.878	-	277.15378	36.73132	0.95	0.1144	283229	14.40	1.12
26.329	-	264.10184	35.06466	0.97	0.1156	287627	2.31	1.02
27.229	-	392.36749	50.43381	0.93	0.1178	296127	4.53	1.03
28.583	-	270.28976	35.00779	0.98	0.1189	320223	6.72	1.05
31.125	-	488.83429	60.11935	0.99	0.1233	352869	12.33	1.09

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

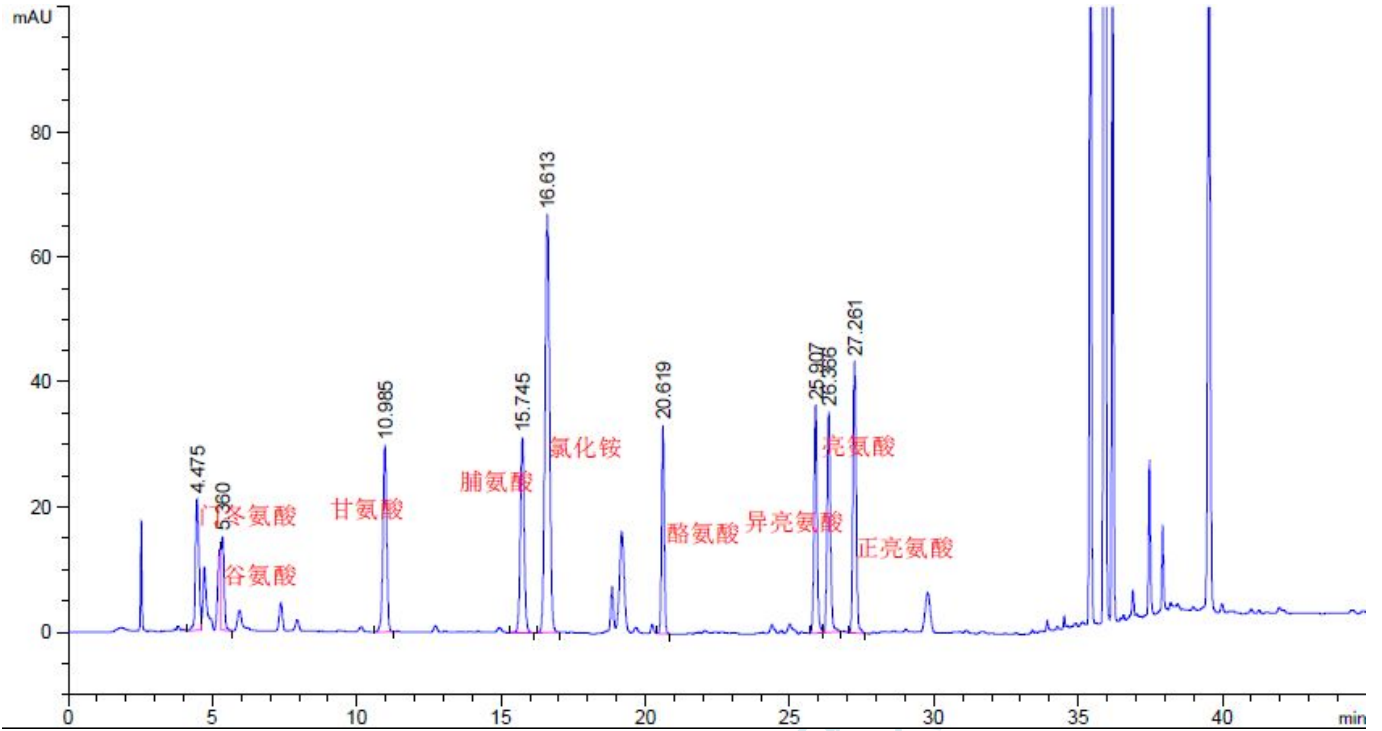
Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

邮编: 321000

E-mail: Houzisheng@welchmat.com

3、多肽氨基酸水解样品



保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
4.475	-	178.90269	20.97310	0.81	0.1317	6404	-	-
5.360	-	113.20995	15.02483	0.88	0.1259	10035	4.04	1.20
10.985	-	264.75015	29.99422	1.06	0.1337	37393	25.46	2.05
15.745	-	293.69589	31.20290	0.97	0.1435	66689	20.18	1.43
16.613	-	737.64404	66.76994	0.97	0.1710	52297	3.24	1.06
20.619	-	210.88905	33.34280	0.97	0.0971	249973	17.56	1.24
25.907	-	277.83963	36.45797	0.92	0.1150	281289	29.30	1.26
26.366	-	280.56076	35.41589	0.88	0.1185	274068	2.31	1.02
27.261	-	336.74136	43.44285	0.93	0.1180	295809	4.45	1.03

六. 计算

样品溶液中各种氨基酸浓度 (mg/mL) = $f_1/f_2 \times C$

其中: f_1 = 样品溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

f_2 = 混合氨基酸标准溶液中各氨基酸峰面积/内标峰面积

C = 氨基酸对照品浓度 (mg/mL)

样品氨基酸质量 M (样) = C (样) × V (样)

计算结果:

样品名称	样品氨基酸浓度 (mg/ml)	样品氨基酸质量 (mg)	氨基酸总质量/多 肽样品氨基酸质 量 (mg/mg)	氨基酸比值
门冬氨酸	0.04986	0.20493	0.106734	1.0274
谷氨酸	0.03917	0.19585	0.102005	0.8883
甘氨酸	0.02323	0.11615	0.060495	1.0325
脯氨酸	0.03606	0.18030	0.093906	1.0450
氯化铵	0.05786	0.28930	0.150677	-
酪氨酸	0.04157	0.20785	0.108255	0.7652
异亮氨酸	0.03830	0.19150	0.09974	0.9742
亮氨酸	0.04059	0.20295	0.105703	1.0325

氨基酸比值的测定: 以样品中门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸和亮氨酸这六种氨基酸的摩尔数之和的六分之一为基准,以样品中各种氨基酸的摩尔数除以基准摩尔数即为氨基酸的比值。门冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、异亮氨酸和亮氨酸这六种氨基酸的氨基酸比值应在 0.9-1.1 范围内;酪氨酸的氨基酸比值范围应在 0.7-1.05 范围内;半胱氨酸的氨基酸比值范围应在 1.4-2.1 范围内。

报告签字

测试: 张厚才

日期: 2014-5-30

审核: 薛昆鹏

日期: 2014-5-30

声明:除非另有说明,此报告结果仅对该测试样品负责。本报告未经公司许可,不可复制。

Add:浙江省金华市仙源路 855 号研发展示中心 01 号 6 楼

Tel:400-808-6760

邮编: 321000

E-mail: Houqizhong@welchmat.com