

快速、准确、灵敏、重现性好的 HPLC 氨基酸分析方法

安捷伦 1100 HPLC 与 Zorbax Eclipse-AAA 柱 分析氨基酸

John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer,
Cliff Woodward

理想的氨基酸定量分析方法，运用了可靠的衍生化反应和分析技术，实现了快速和高灵敏度分析。自动在线衍生化与 HPLC 相结合，其中一级氨基酸用邻苯二甲醛 (OPA)、二级氨基酸用 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 进行衍生。安捷伦 1100 HPLC 方法使整个分析过程快速、准确、灵敏且重现性好。

快速柱前衍生化反应——氨基酸 (AA) 与 OPA 和 FMOC 发生衍生反应，然后进行色谱分析。酸水解后的蛋白质/多肽样品在 pH 10.2 的缓冲液中可以直接衍生化。在 3-巯基丙酸 (3-MPA) 存在下一级氨基酸首先与 OPA 反应，而二级氨基酸不和 OPA 反应，然后再用 FMOC 进行衍生。加入的吡啶与 3-MPA 相结合可降低氨基酸的疏水性，所以 OPA 衍生化产物比 FMOC 衍生化产物的色谱出峰时间更早。过剩的 FMOC 及其降解产物在二级氨基酸后出峰，不会干扰分析。

衍生化过程快速，而且使用安捷伦 1313A 自动进样器可非常容易实现自动化。由于反应速度的优势，两个衍

生化反应都能在室温下完成。自动衍生过程可提供较高的重现性。在柱长 75-mm 的色谱柱上，从两次进样之间的时间间隔仅需 14 分钟 (分析运行时间仅 10 分钟)。在柱长 150-mm 的色谱柱上的总分析时间为 26 分钟 (分析运行时间 16 分钟)。以上两种分析都提供较高的样品通量。

分离选项

Zorbax Eclipse-AAA 柱的反相填料每批都经检验合格。按照本应用报告

具体操作步骤操作，可分离蛋白质/多肽水解产物中的常见氨基酸。

A 和 B 流动相很容易制备，梯度洗脱具有一定的线性范围 (详见流动相一节中的实验条件)。安捷伦 1100 HPLC 二元或四元泵都可使用此方法。色谱图 1: 安捷伦 1100 HPLC 二元泵及二极管阵列检测器 (DAD) 得到的高通量应用中常见的灵敏度。在保证足够分辨率的前提下，一次完整的样品分析可在 14 分钟内完成 (包括再平衡)。分离条件详见实验条件一节。

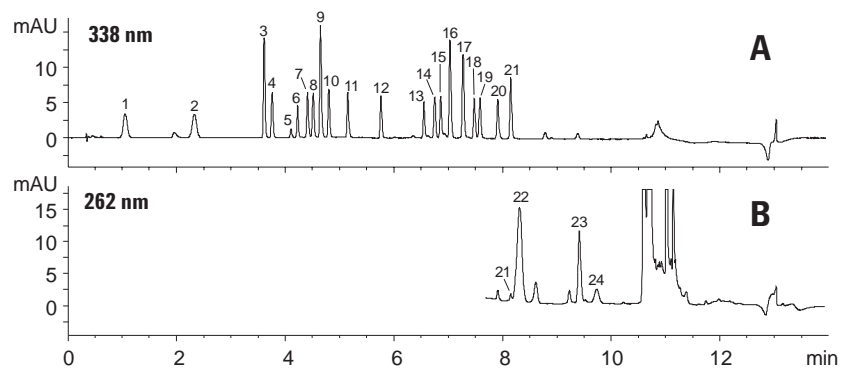


图 1: 常规分析: Eclipse-AAA 色谱柱高通量分离 24 种氨基酸。色谱柱尺寸为 4.6 x 75 mm, 3.5 μm。色谱峰列表见表 1。检测器: A. 338 nm (OPA-氨基酸), B. 262 nm (FMOC-氨基酸)。

一级氨基酸 (OPA 衍生), 338 nm 检测见图 1A, 二级氨基酸 (FMOC 衍生), 262 nm 检测见图 1B。进样量: 每种 125 pmol 的氨基酸进样 0.5 μ L。

表1. 按Eclipse-AAA色谱柱上氨基酸的出峰顺序

峰号	氨基酸	缩写
1	天门冬氨酸	ASP
2	谷氨酸	GLU
3	天门冬酰胺	ASN
4	丝氨酸	SER
5	谷氨酰胺	GLN
6	组氨酸	HIS
7	甘氨酸	GLY
8	苏氨酸	THR
9	瓜氨酸	CIT
10	精氨酸	ARG
11	丙氨酸	ALA
12	酪氨酸	TYR
13	胱氨酸	CY2
14	缬氨酸	VAL
15	蛋氨酸	MET
16	正缬氨酸	NVA
17	色氨酸	TRP
18	苯丙氨酸	PHE
19	异亮氨酸	ILE
20	亮氨酸	LEU
21	赖氨酸	LYS
22	羟脯氨酸	HYP
23	肌氨酸	SAR
24	脯氨酸	PRO

如果希望比 75-mm 柱高通量分离时 (图1) 更高的分辨率, 可使用 150-mm 的色谱柱。图 2 是在普通灵敏度下的高分辨分离, 分别使用了两种不同填料粒径的 150 mm Zorbax Eclipse-AAA 色谱柱——3.5 μ m 填料与 5 μ m 填料。一级氨基酸 OPA 衍生化产物的 338 nm 色谱图。谱图性能相近, 但 3.5- μ m 色谱柱由于具有较高的柱效因此分辨率更高。

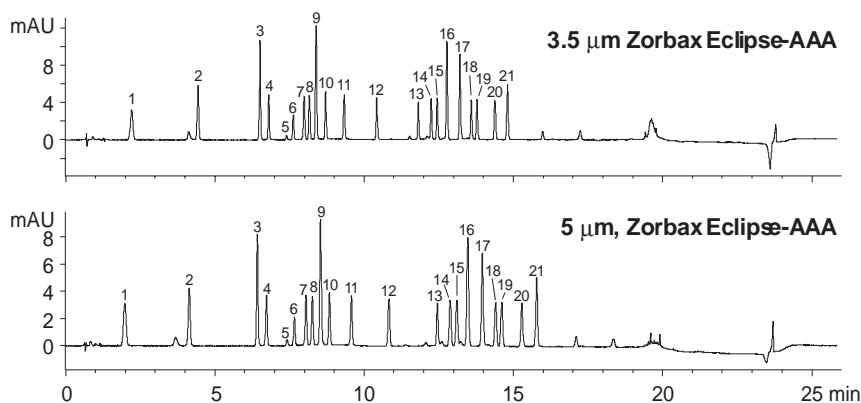


图2: 21种氨基酸的高分辨分离: 分别使用5 μ m和3.5 μ m Zorbax Eclipse-AAA柱。柱尺寸为4.6 x 150mm。色谱峰的列表见表1。检测器: 338 nm(OPA 氨基酸)

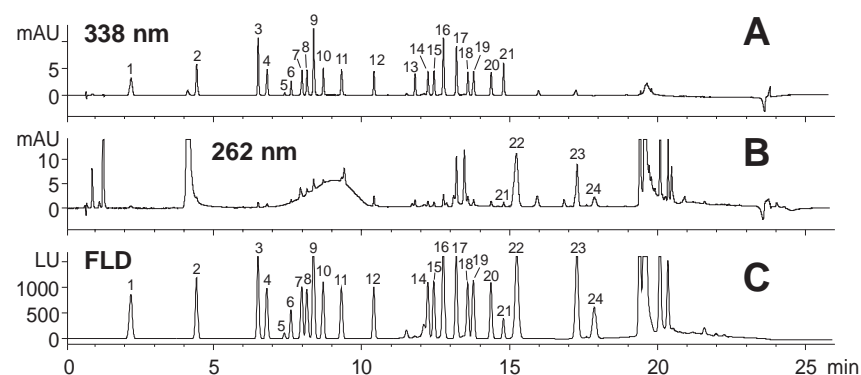


图3: 不同的检测方式, Zorbax Eclipse-AAA 高灵敏度、高分辨分析氨基酸。柱尺寸为4.6 x 150 mm, 3.5 μ m。色谱峰的列表见表1。检测: A UV 338 nm (OPA 氨基酸), B. UV 262 nm(FMOC-氨基酸), C. 荧光(详见实验条件)。

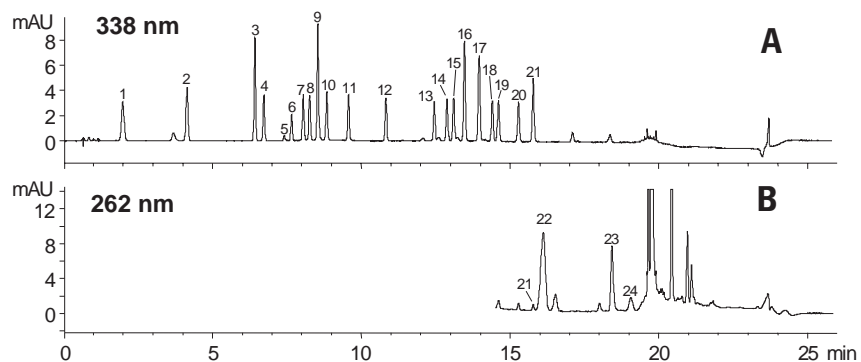


图4: Eclipse-AAA 高分辨分离 24 种氨基酸, 常规分析。柱尺寸为 4.6 x 150 mm, 5 μ m。色谱峰的列表见表1。检测: A UV 338 nm (OPA 氨基酸), B. UV 262 nm(FMOC-氨基酸)。

3.5 μm 较小填料的色谱柱柱后压为 240–300 bar (3530–4410 psi), 而 5 μm 柱的柱后压为 160–210 bar (2350–3090 psi)。因此, 如果只分离一级氨基酸, 使用 15-cm 色谱柱时, 则选用较大的 5- μm 填料, 此时系统的柱后压较低。

图 3 和图 4, 可以清楚地对比 15-cm. 3.5- μm 柱和 5- μm 色谱柱。图 3A: 检测波长 338 nm, 分离一级氨基酸; 图 3B: 检测波长 262 nm; 图 3C: 荧光检测。注意图 3 和图 4 中峰 21 (赖氨酸) 和峰 22 (羟脯氨酸) 的分离度。使用粒径较小填料、较长的色谱柱 (150 mm, 3.5 μm) 时, 色谱峰的分离度增加, 同时为峰 21 和峰 22 之间进行 DAD 波长或荧光检测切换提供了足够的时间窗口。

用 262 nm 检测 (图 3B) 时, 衍生副产物导致在 7 到 10 分钟之间的基线隆起一个小包。由于此时只需检测一级氨基酸 (338 nm), 这个隆起的小包不会影响其检测或分辨率。最好在两个波长下都检测二级氨基酸, 如羟脯氨酸。否则, 可进行波长切换。

由于检测时的温度、流动相等会发生变化, 荧光 (或 UV) 波长切换的时间可能略有不同。图 3C 荧光检测: 450 nm (Ex = 340 nm), 在峰 21 赖氨酸峰流出后, 峰 22 (羟脯氨酸) 出峰前, 切换波长到 305 nm。波长切换编程在 15 分钟时切换波长。详见实验条件一节中的检测设置。24# (脯氨酸) 出峰后, 升高梯度到 100%B 相, 以洗出柱内的衍生化反应副产物。100%B 洗

脱 3.7 分钟后, 回到初始条件, 为下一次进样平衡色谱柱。注意在荧光检测的色谱图中, 峰 13 (胱氨酸) 没有荧光, 因此无法被检出。

赖氨酸-羟脯氨酸的分离与波长切换

赖氨酸和羟脯氨酸的分析对检测参数的选择、色谱柱配置, 乃至运行时间有重大影响。在羟脯氨酸之前被洗脱出来的氨基酸 (包括赖氨酸) 都是用 OPA 衍生, 338 nm 检测。赖氨酸出峰后, 羟脯氨酸立刻被洗脱下来, 这是第一个用 FMOC 衍生的氨基酸, 必须用 262 nm 检测。最简单的解决方案: 使用安捷伦 1100 DAD 或 MWD (多波长检测器) 分别连续收集 338 nm 和 262 nm 两个波长的信号。

如果没有 DAD 和 MWD, 收集单通道信号的波长可以在精心选择的条件下进行切换, 以检测 OPA 和 FMOC 衍生的氨基酸。可以用一个通道进行数据收集, 例如, 使用安捷伦 1100 VWD

(可变波长检测器)。如果使用更复杂的梯度洗脱, 还可提高赖氨酸和羟脯氨酸的分辨率。要了解其它信息, 请上网查寻 www.agilent.com/chem/Technical_Support/ / “User Contributed Software”。

如果羟脯氨酸不是感兴趣的待测物 (例如, 分析蛋白质水解产物), 则可以使用任何色谱柱配置, 并在赖氨酸和第一个 FMOC-氨基酸 (肌氨酸或脯氨酸) 之间进行波长切换。在这种情况下, 可以使用 4.6 x 75 mm 尺寸的色谱柱, 分析时间能节省一半。

与 HP 1090 HPLC 上的 AMINOQUANT 方法作比较

图 5A 是在 HP 1090 HPLC 上用特定的流动相、色谱柱和流速, 按照原来的 AminoQuant 方法 (应用报告, HP 出版号 5954-6257) 得到的色谱图。在这一分离中有 5 对难分离的氨基酸 (asp/glu, his/gly, ala/arg, val/met

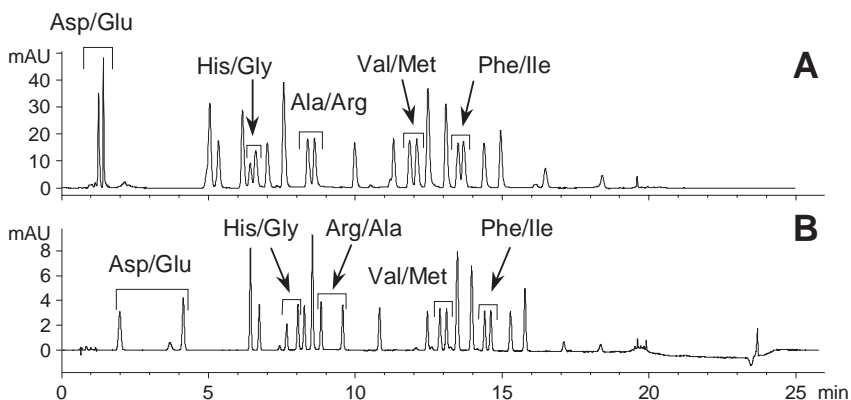


图 5: 氨基酸分析方法的比较。A) 用 Hypersil AA 柱在 HP 1090 HPLC 上使用 AminoQuant 方法。B) 用 Zorbax Eclipse-AAA 柱 (4.6 x 150 mm, 5 μm) 在安捷伦 1100 HPLC 上进行分析。

and phe/ile)。其中 asp/glu 这一对氨基酸的色谱峰与死体积非常接近。

图 5B 是用 Zorbax Eclipse-AAA 柱得到的色谱图。所有难分离氨基酸对的分辨率都得到了改善，特别是第一对，asp/glu，现在延长了保留时间，能与色谱柱的死体积明显分开。而且，同样在 HP 1090 仪器上，用 Eclipse-AAA 柱和用原来的 AminoQuant 方法相比，精氨酸在丙氨酸前出峰。

重现性

表 2 显示了在 Zorbax Eclipse-AAA 柱(4.6 x 150 mm, 3.5 μ m)上对氨基酸衍生化后混合物连续进样(n=6)的分析结果。每次都进行单独衍生化和色谱分离。保留时间重现性相当好，平均相对标准偏差(%rsd)为 0.18%。衍生化反应的重现性用峰面积表示，平均%rsd为2.0%。这些数据与在 HP 1090 上用原来的 AminoQuant 方法得到的结果相当(分别为 0.23 %和2.3 %，参见LC/GC International 第 5 卷第 2 期，1992 年 2 月，第 44 到 49 页)。

线性和灵敏度

Eclipse-AAA 分析氨基酸标样(0.5 μ l)的线性范围是 4.5 pmol 到 450 pmol。图 6 显示了几种氨基酸用 DAD 或 FLD 检测的校正曲线。无论用 DAD 还是 FLD 检测器进行校正，所有 24 种氨基酸的相关系数都在 0.99900 和 1.00000 之间。

5 pmol 和 50 pmol 两个低浓度的衍生化氨基酸，分别用 DAD 和 FLD 检测，分析结果见图 7 和图 8。用 DAD (图 7)，每种氨基酸均约在 10 pmol 左右能够检出。用 FLD (图 8) 灵敏度比 DAD 更高。

氨基酸	保留时间	峰面积
	%rsd	%rsd
ASP	0.58	0.8
GLU	0.33	3.0
ASN	0.16	2.2
SER	0.12	2.8
GLN	0.12	2.4
HIS	0.11	2.7
GLY	0.15	2.5
THR	0.12	1.1
CIT	0.10	3.5
ARG	0.36	2.3
ALA	0.11	0.9
TYR	0.12	0.7
CY2	0.17	0.6
VAL	0.16	0.5
MET	0.17	1.1
NVA	0.15	0.7
TRP	0.18	0.8
PHE	0.14	0.8
ILE	0.14	1.1
LEU	0.18	1.0
LYS	0.19	3.2
HYP	0.13	4.2
SAR	0.14	6.8
PRO	0.12	2.7
平均	0.18	2.0

表 2: Zorbax Eclipse-AAA 分析氨基酸的重现性。四元泵的安捷伦 1100 系统。重复分析六次所得结果。

结论

经 OPA 和 FMOC 化学衍生，用 Zorbax Eclipse-AAA 柱和安捷伦 1100 HPLC，蛋白质和多肽水解产物的氨基酸分析可以在 10 分钟内完成。本方法与原来在 HP1090 HPLC 系统上的 AminoQuant 方法相比，5 个难分离氨基酸对的保留得到了改善。在 Eclipse-AAA 柱上氨基酸分析的重现

性与原来的 AminoQuant 方法相当，流动相的制备更简单，只需要调节缓冲液(A相) pH 值。

色谱柱的选择取决于所需要的分析速度和分辨率：

ZORBAX Eclipse-AAA 4.6 x 75 mm (3.5 μ m) 用 DAD 适用于普通灵敏度、高通量分析。

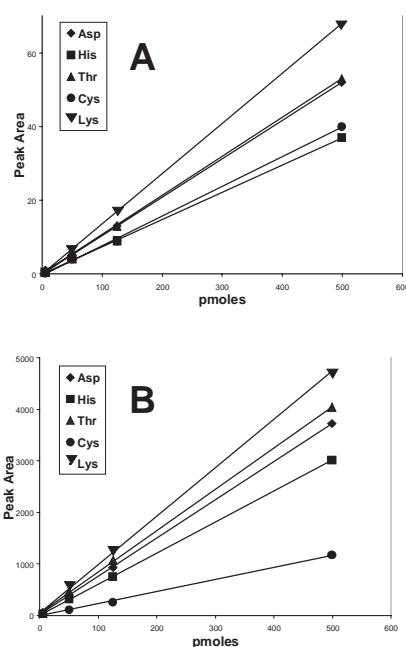


图 6: 氨基酸衍生化产物分析的校正曲线，A 用 UV 检测，B 用 FLD 检测。线性范围为 0.5 μ l 样品 4.5 到 450 pmol。

ZORBAX Eclipse-AAA 4.6 x 150 mm(5 μ m) 用 DAD 适用于普通灵敏度、较低柱后压，高分辨率分析。

ZORBAX Eclipse-AAA 4.6 x 150 mm (3.5 μ m) 用 FLD 适用于高灵敏度、高分辨率的分析。

ZORBAX Eclipse-AAA 3.0 x 150 mm, (3.5 μ m), 2000 秋上市, 适用于

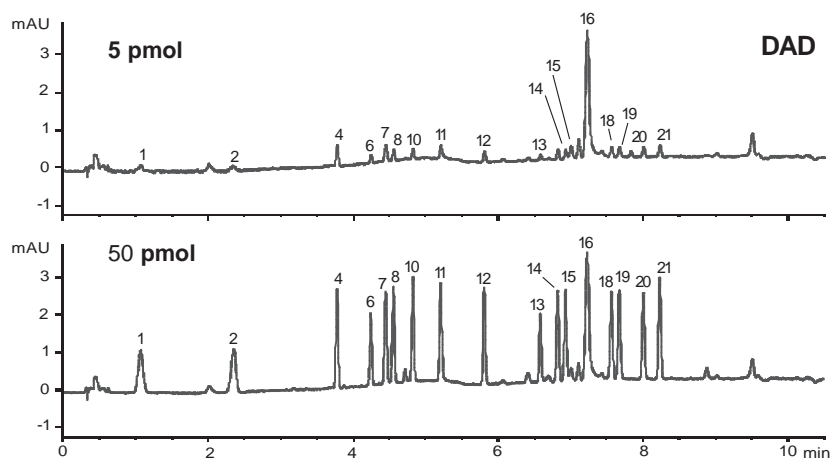


图7: UV 检测器 338 nm 检测时不同浓度氨基酸的响应(OPA 衍生化产物)。

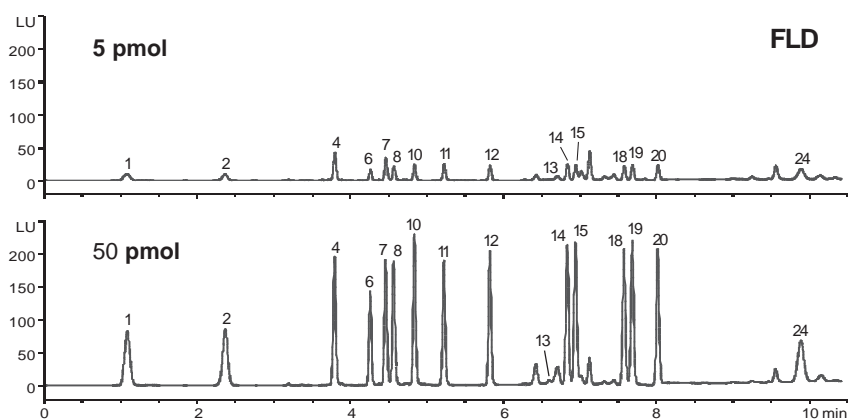


图8: 荧光检测器检测时不同浓度氨基酸的响应。光电倍增器管的增益=10。

样品和溶剂消耗较少的高灵敏度、高分辨率分析。

使用安捷伦 1313A 自动进样器, 可以进行自动柱前衍生操作, 加快了速度, 提高了反应的重现性, 并将操作污染减到最小。这个分析方法适用于用 DAD 和收集双波长数据, 或进行编程波长切换, 对一级和二级氨基酸的常规分析。如果要进行高灵敏度分析, 需要适用荧光检测器。

实验条件

用下列实验条件得到的色谱图见图 1-8:

仪器

色谱仪器系统: 安捷伦 1100 HPLC, G1312A 二元泵、G1315A 二极管阵列检测器 (DAD)、6-mm 或 10-mm 流通池, 和 / 或 G1315A 荧光检测器 (FLD)。此条件同样适用于安捷伦 1100 四元泵 (G1311A)。

HPLC 色谱柱

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 75 mm, 3.5 μ m
PN 966400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 3.5 μ m
PN 963400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 5 μ m
PN 993400-902

可选保护柱*

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 12.5 mm, 5 μ m, 4个/包
PN 820950-931

ZORBAX Eclipse-AAA
3.0 x 150 mm, 3.5 μ m 2000 秋上市

* 保护柱应使用一个低死体积的连接头直接连接到分析柱上。

流动相

A: 40 mM Na_2HPO_4 pH 7.8 (5.5 克 NaH_2PO_4 (含 1 分子水) + 1 升水, 用 (10 N) NaOH 溶液调 pH 至 7.8。
B: ACN: MeOH: 水 (45:45:10, v/v/v)
通常将流动相 A 配制成不调 pH 的 10 倍浓度的储备液。溶液可以保存几周, 用时再稀释并将 pH 调至 7.8。流动相用的所有溶剂都应是 HPLC 级的。

泵的设置

流速: 2 mL/min
停止时间: 14 分钟 (75-mm 柱) 或 26 分钟 (150-mm 柱)
柱后时间: off

辅助泵设置:

最大流量程序: 100 mL/min²
压缩性 A: 50×10^{-6}
最小冲程 A: 20 μ L
压缩性 B: 115×10^{-6}
最小冲程 B: 自动

梯度:

适用于 75 mm 柱长 时间(分钟)	% B
0	0
1	0
9.8	57
10	100
12	100
12.5	0
14	0

适用于 150 mm 柱长 时间(分钟)	% B
0	0
1.9	0
18.1	57
18.6	100
22.3	100
23.2	0
26	0

注: 当色谱柱将过夜或更长时间不使用时, 用10个柱体积的100%B冲洗色谱柱, 可延长柱寿命。

检测器设置

DAD:

所需光源:

UV灯: 需要

可见灯: 不需要

UV: 338 nm, 10 nm 带宽(bw), 参比: 390 nm, 20 nm bw(适用于OPA-氨基酸)

262 nm, 16 nm bw, 参比: 324 nm, 8 nm bw (适用于FMOC-氨基酸)

峰宽: >0.03分钟 (0.5 秒)

狭缝: 4 nm

FLD:

适用于 75 mm 柱

时间 (min)	Ex/Em (nm)	PMT 增益
0	340/450	10
8.5*	266/305	9

适用于 150 mm 柱

时间 (min)	Ex/Em (nm)	PMT 增益
0	340/450	10
15*	266/305	9

* 切换荧光波长的具体时间可能因温度和流动相等的变化而异。

峰宽: >0.5分钟

自动进样器:

参见样品瓶的位置 (图 9)

进样器程序:

从瓶1中吸取2.5 μL (硼酸盐缓冲液)
吸取 0.5 μL 样品 (如, 可选择 11 号瓶作为氨基酸样品)

“在空气中”混合 3 μL, 最大速度, 2 次

等待0.5 分钟

从瓶 2 中吸取 0 μL (用未加盖瓶中的水清洗针头)

从瓶 3 中吸取 0.5 μL (OPA)

“在空气中”混合 3 μL, 最大速度, 6 次

从瓶 2 中吸取 0 μL(用未加盖瓶中的水清洗针头)

从瓶 4 中吸取 0.5 μL(FMOC)

“在空气中”混合 4 μL, 最大速度, 6 次

[当用于高灵敏度分析时可选择针头清洗: 从瓶 6 中吸取 0.0 μL (ACN, 乙腈)]

从瓶 5 中吸取 32 μL (水)

“在空气中”混合 18 μL, 最大速度, 2 次

进样

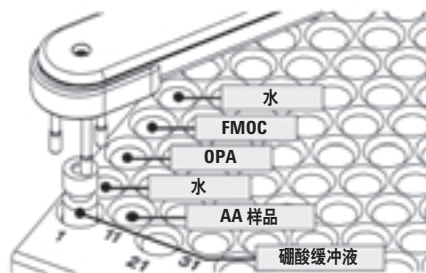


图 9: 安捷伦 1313A 自动进样器上样品瓶的位置。

该样品瓶位置为所列的进样器程序而设计。

辅助:

吸液速度 200 μL/min

喷液速度 600 μL/min

吸液位置 0.0 mm

样品瓶:

需要使用带聚合物支架的锥形内衬管 (图 10A) 装盛 OPA 和 FMOC 试剂。

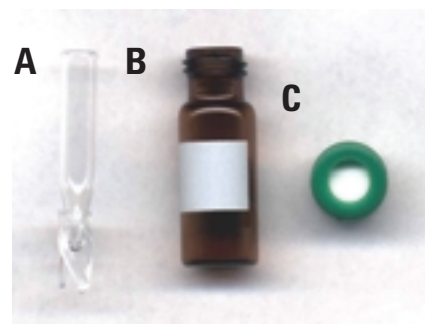


图 10: 内插管、样品瓶和瓶盖。氨基酸分析时安捷伦1100自动进样器上使用的锥形内插管 A (安捷伦 PN 5181-1270), 棕色广口样品瓶 B (安捷伦 PN 5182-0716), 螺纹盖 C (安捷伦 PN 5182-0721)。

由于体积有限, 内插管适用于广口螺纹或钳盖样品瓶(图10B-C)。但不能使用卡口瓶, 因为 FMOC 挥发性强, OPA 在氧存在下缓慢降解, 这两种试剂都对密封垫密闭性要求很高。注意不要使用为其它仪器设计的样品瓶或瓶盖, 否则可能损坏安捷伦 G1313A 自动进样器。

柱温箱:

温度: 40°C (左侧和右侧)

适合分析: 温度在设定点 $\pm 0.8^\circ\text{C}$ 之间

衍生化试剂

硼酸盐缓冲液:

安捷伦 PN 5061-3339

0.4 N 水溶液, pH 10.2。冷藏(4°C), 如有必要可分装。

FMOC 试剂:

安捷伦 PN 5061-3337

从1-mL FMOC中吸100-μL FMOC, 加入到锥形内插管中, 立即盖封, 冷藏(4°C); 分装后的溶液最多可以使用 7-10 天。

OPA 试剂:

安捷伦 PN 5061-3335

从 1-mL OPA 中吸 100- μ L OPA, 加入到锥形内插管中, 立即盖封, 冷藏 (4 $^{\circ}$ C); 分装后的溶液最多可以使用 7-10 天。

水: 去离子水, HPLC 级

规格和部件号见 [订购信息](#)。

样品制备

注: 样品瓶必须每天更换。每个 1 mL 安瓿瓶中所含的溶液可供 10 天使用 (1000 μ L/100 μ L = 10 天)。

用于色谱对照的氨基酸混合液

氨基酸色谱分析时, 250 pmol/ μ L 的 17 种氨基酸混合标样 (PN: 5061-3331), 加上瓜氨酸和 6 种补充氨基酸, 浓度约 250 pmol/ μ L。混合液由下列两种储备液制备而成。将 1 μ L 补充氨基酸储备液加至装有新取的 250 pmol (100 μ L) 标准的锥形内插管中。用旋涡混合器混合, 配制成 24 种成分的标样, 以备进样 (250 pmol/L)。

250 pmol 标准:

将 1mL 安瓿瓶的 250pmol/ μ L 氨基酸 (PN 5061-3331) 分装成各 100 μ L, 装入样品瓶的锥形内插管中, 盖封, 4 $^{\circ}$ C 冷藏。

补充氨基酸储备液:

称取试剂盒 (PN 5062-2478) 中的补充氨基酸 (gln, asn, trp, nva, hyp, sar) 各 0.25 mmol, 置 20-mL 瓶中。加入 5 mL 去离子水, 在热水浴中超声, 使

其溶解。再加 5 mL 水稀释。冷藏保存 (4 $^{\circ}$ C)。将同样浓度的瓜氨酸 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 加入到混合液中。

保存时不要让补充氨基酸与氨基酸标样混合。因为某些补充氨基酸会在 HCl 中降解 (特别是谷氨酰胺, 天门冬酰胺也有一定程度的降解)。

用于绘制校正曲线的氨基酸混合液

各种浓度的 17 种氨基酸, 加上 4 种补充氨基酸, 与固定量的内标 (ISTD) 一起, 用于建立校正曲线。内标 (正缬氨酸和肌氨酸) 是补充氨基酸试剂盒 (PN: 5062-2478) 的一部分。试剂盒中的其它氨基酸 (gln, asn, trp, hyp) 为补充氨基酸 (补充氨基酸)。参见表 3 和表 4, 配制低灵敏度和高灵敏度的标样。

氨基酸标样 (10 pmol/ μ L 到 1nmol/ μ L):

从 PN5061-3330 到 5061-3334 的 1 mL 安瓿瓶标样中各取 100 μ L, 置于样品瓶内插管中, 盖封, 4 $^{\circ}$ C 冷藏。根据实验需要, 校正曲线可用 2 至 5 个标样绘制。

补充氨基酸储备液:

该溶液由补充氨基酸试剂盒 (PN: 5062-2478) 中 6 种氨基酸中的 4 种氨基酸组成。用于低灵敏度标准 (表 3) 时, 制成含谷氨酰胺、天门冬酰胺、色氨酸、4-羟基-脯氨酸 18 nmol/ μ L 的去离子水溶液 25-mL。超声处理直至溶解。4 $^{\circ}$ C 冷藏保存。用于高灵敏度标准 (表 4) 时, 将 18 nmol/ μ L 溶液

用 45 mL 去离子水稀释 5 倍, 制成 1.8 nmol/ μ L 溶液。

内标 (ISTD) 储备液:

用补充氨基酸试剂盒 (PN: 5062-2478) 六种氨基酸中的两种制成。用于低灵敏度 (表 3) 时, 制成含正缬氨酸和肌氨酸 10 nmol/ μ L 的去离子水溶液 25-mL。超声处理直至溶解。冷藏保存 (4 $^{\circ}$ C)。用于高灵敏度 (表 4) 时, 将 5 mL 10 nmol/ μ L 标样用 45 mL 去离子水稀释成 1 nmol/ μ L, 冷藏保存 (4 $^{\circ}$ C)。

其他支持

通过安捷伦网站可以下载用户为各种类型色谱柱、书写文件提供的方法文件, 以及氨基酸报告和宏。
www.agilent.com/chem,
“Technical Supportlc” / “User Contributed Software”。

表3：低灵敏度氨基酸标准溶液的制备。按所示体积混合储备液配制三种低灵敏度标样。

	最终溶液的氨基酸浓度(pmol/μL)		
	900	225	90
取 5 mL 18nmol 补充氨基酸	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1NHCl 稀释	—	15 mL	45 mL
稀释后的补充氨基酸混合液	5 mL	20 mL	50 mL
取 5 mL 稀释后的补充氨基酸混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加 10 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
补充氨基酸-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
取 100 μL 补充氨基酸-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
加 1000 pmol 氨基酸标样	900 μL	—	—
加 250 pmol 氨基酸标样	—	900 μL	—
加 100 pmol 氨基酸标样	—	—	900 μL
含补充氨基酸和 500 pmol/μL ISTD 的最终氨基酸	1 mL	1 mL	1 mL

表4：高灵敏度氨基酸标准溶液的制备。按所示体积混合储备液配制三种高灵敏度标样。

	最终溶液的氨基酸浓度(pmol/μL)		
	90	22.5	9
取 5 mL 1.8nmol 补充氨基酸	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1NHCl 稀释	—	15 mL	45 mL
稀释后的补充氨基酸混合液	5 mL	20 mL	50 mL
取 5 mL 稀释的补充氨基酸混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加 1nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
补充氨基酸-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
取 100 μL 补充氨基酸-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
加 100 pmol 氨基酸标样	900 μL	—	—
加 25 pmol 氨基酸标样	—	900 μL	—
加 10 pmol 氨基酸标样	—	—	900 μL
含补充氨基酸和 50 pmol/mL ISTD 的最终氨基酸	1 mL	1 mL	1 mL

订购信息

Eclipse-AAA HPLC柱			
规格	尺寸 (mm)	粒径 (μm)	安捷伦 部件号
分析, 普通灵敏度, 高分辨	4.6 x 150	5 μm	993400-902
分析, 高灵敏度、高分辨, 使用FLD	4.6 x 150	3.5 μm	963400-902
分析, 普通灵敏度, 高通量	4.6 x 75	3.5 μm	966400-902
分析, 高灵敏度, 高分辨, 使用DAD或FLD	3.0 x 150	3.5 μm	961400-302
保护柱(4/包)	4.6 x 12.5	5 μm	820950-931
保护柱硬件工具包	-	-	820777-901

衍生化试剂

规格	安捷伦 部件号
硼酸缓冲液: 0.4 M水溶液, pH 10.2, 100 mL	5061-3339
FMOC试剂, 2.5 mg/mL乙腈溶液, 10 x 1 mL安瓿瓶	5061-3337
OPA试剂, 10 mg/mL溶于0.4 M硼酸缓冲液和 3-巯基丙酸, 6 x 1 mL 安瓿瓶	5061-3335
分析半胱氨酸用的DTDPA试剂, 5g	5062-2479

样品瓶

规格	安捷伦 部件号
100 μL 带聚合物支架的锥形内插管, 100/包 棕色、广口、带书写处、螺纹盖样品瓶	5181-1270
2 mL, 100/包	5182-0716
绿色螺纹盖, PTFE/硅橡胶密封垫, 100/包	5182-0721

标准品

规格	安捷伦 部件号
氨基酸标样溶于0.1 M HCl, 10 x 1 mL 安瓿瓶	
1 nmol /ml	5061-3330
250 pmol /ml	5061-3331
100 pmol /ml	5061-3332
25 pmol /ml	5061-3333
10 pmol /ml	5061-3334
补充氨基酸 Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp, 各1g	5062-2478

其它支持

类别
用户提供的化学工作站方法文件、定制的氨基酸报告和宏、其它文件, 均可从网上下载: www.agilent.com/chem, “Technical Supportlc” / “User Contributed Software” .

安捷伦公司版权所有。未经许可不得翻印、改编或翻译。

