

用 1.8 μm 反相(RP)色谱柱进行快速氨基酸分析(AAA)

应用

制药与食品

作者

Cliff Woodward and John W. Henderson Jr.
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Todd Wielgos
Baxter Healthcare Corp.
Round Lake, IL 60073
USA

摘要

氨基酸分析(AAA)常被用作蛋白质组学和食品质量检测中测定样品中氨基酸(AA)准确组成的工具。为了及时分析样品,需要分析周期短;为了测定有限量的样品需要高灵敏度的方法;为了提高实验室效率,需要自动化的方法。本文报道了用新开发的 1.8 μm 粒径色谱柱测定氨基酸的新方法。这种专利的填料经过专门设计,其产生的反压比市场上任何其它亚 2 微米填料都小,可以在 400 bar HPLC 系统以及耐压更高的仪器上使用。我们采用惠普/安捷伦公司 1988 年首次推出的 OPA/FMOC 化学衍生法,并改善了以前方法的精密度的分析时间、柱寿命和耐用性[1-4]。

引言

氨基酸的检测和定量分析一直是蛋白质和食品分析的重要部分,1951 年 Moore 和 Stein 研制出了第一台氨基酸分析仪,将未衍生的氨基酸(AAs)用离子交换色谱分离后,用茚三酮进行柱后衍生,在可见区检测[5]。1958 年由 Beckman 开发并推出了全自动分析仪。它成为蛋白质分析的里程碑,并在 1972 年诺贝尔化学奖核糖核酸酶的研究中发挥了重要作用。以前需要几周完成的分析,用该方法不到 1 天就可以完成。Beckman 新一代的氨基酸分析仪已将分析时间缩短到大约 110 分钟,但用茚三酮灵敏度仍然有问题。

用邻苯二甲醛(OPA)和巯基乙醇进行柱后衍生反应有一些可能,但却只能检测一级氨基酸(见图 1a)。1971 年首次报道了用 OPA 对氨基酸进行柱前衍生[6]。衍生物相当不稳定,但这一过程可以实现自动化。灵敏度得到了提高,特别是使用荧光检测(FLD)时。OPA 不发荧光,其衍生物有很强的荧光,但二级氨基酸仍不能检测。另一种衍生试剂氯甲酸 9-芴基甲酯(FMOC)和一级、二级氨基酸都能反应生成稳定的衍生物,但其本身却具有很强的 UV 吸收和荧光(见图 1b) [7]。衍生反应结束后还需要进行提取或与疏水性很强的胺进行反应,以除去过量的 FMOC 和反应副产物[8]。这种方法也可以作为自动化柱前衍生方法[9],



但商品化时存在问题,与没有使用反提取的系统相比,相对标准偏差(RSD)较高。

1986年惠普/安捷伦将这两种化学反应依次结合,不用反提取实现了蛋白质水解液氨基酸的全自动衍生、色谱分离、检测和报告[1]。1988年开发并销售了商品化的分析仪,总分析时间只有36分钟,灵敏度达到飞摩尔水平。这对于生物技术公司和大学的研究人员来说,无疑是迈向正确方向的一步,因为他们的样品非常有限,尤其是在药物研发的早期阶段。

为了使其在商业上可行,需要进行一些化学上的改进:将硫醇换成3-巯基丙酸(MPA)使OPA衍生物更稳定;所有一级氨基酸先与OPA反应,将一级氨基酸从下一步的反应中定量除去;然后加入FMOC,FMOC只与二级氨基酸反应。由于FMOC、FMOC衍生物和反应副产物比任何OPA衍生物的疏水性都强,所以它们不会干扰任何一级氨基酸的检测。因为只有几种FMOC衍生物,所以可以使用简单的两段梯度将这些氨基酸与反应副产物和FMOC分离[1]。详见图1和图2。相应于各个色谱峰的化合物名称见表1。

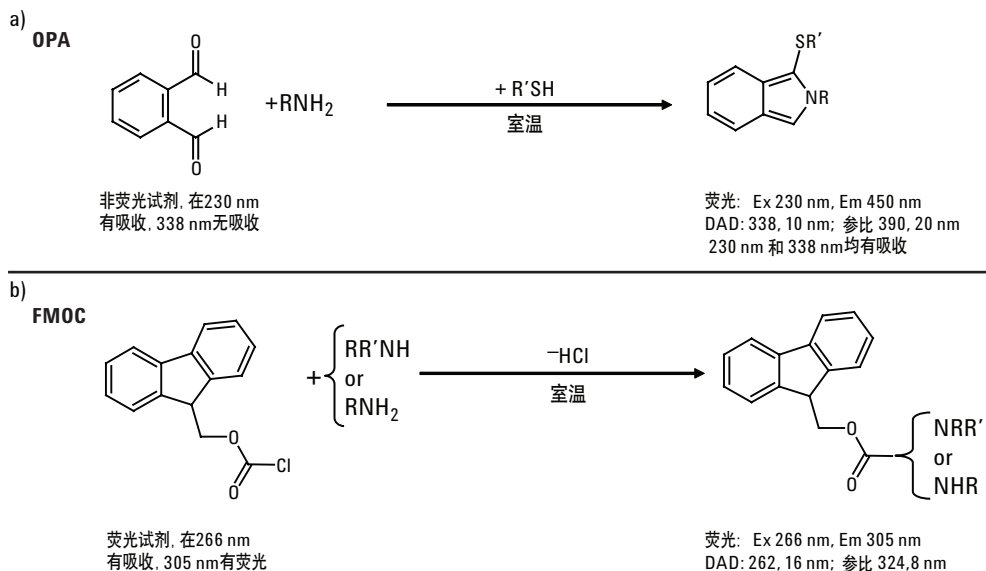


图1. 邻苯二甲醛(OPA)与氯甲酸9-芴基甲酯(FMOC)与胺的反应

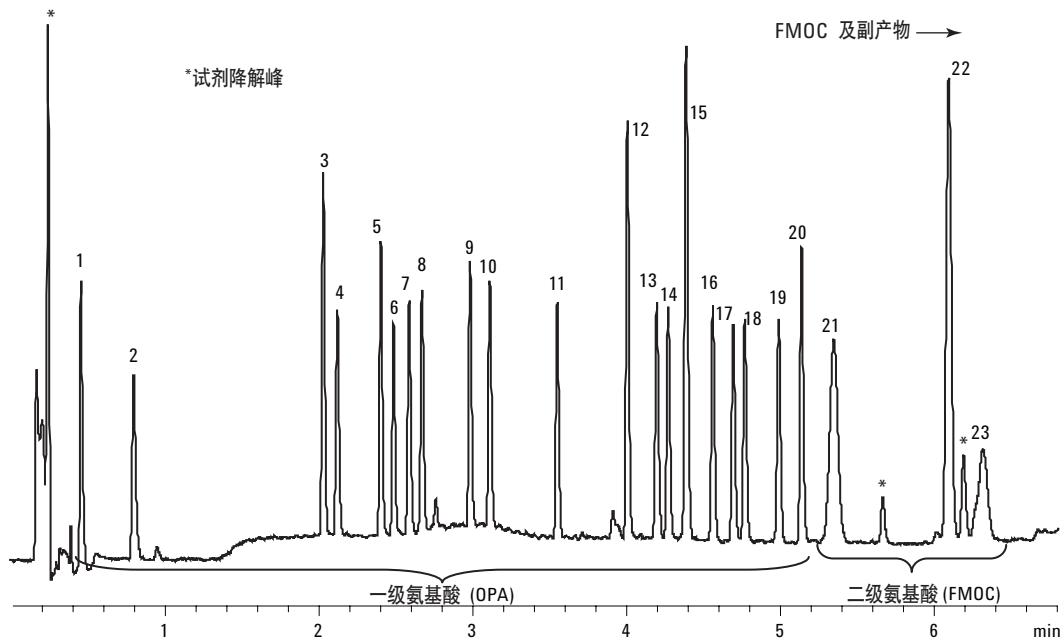


图2. 用快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱(4.6 x 50 mm, 1.8- μ m)进行氨基酸分析: DAD 检测。柱上浓度为 125 pMoles

表 1. OPA 和 FMOC 氨基酸衍生物的名称和洗脱顺序

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

† 内标

实验部分

仪器

本文中的结果都是在 Agilent 1200SL HPLC 系统上测定得到的, 该系统包含以下组件:

G1312B, SL 型二元泵

G1379B, 微量脱气机

G1367C, 高性能多孔板自动进样器(WPS), 配置 54 x 2 mL (前面) 和 15 x 6 mL 样品盘 (后面)

G1316B, SL 型柱温箱(TCC), 安装低扩散组件

G1315C, SL 型二极管阵列检测器(DAD), 配置半微量流通池

G1321A, 荧光检测器(FLD)

仪器上的所有管线内径均为 0.12 mm (0.005 英寸)。

虽然还没有试验过, 但较旧的仪器, 如 1100 二元泵系统, 以及 1100 和 1200 四元泵系统也可以在 4.6 mm 内径柱上完成这些分析。建议没有经过广泛试验不要在这些系统上使用 3.0 mm 和 2.1 mm 内径的柱子, 因为使用这些系统延迟体积较大; 由于延迟体积效应可能使较早洗脱的峰出现异常。

仪器配置

泵参数: 混合器和脉冲阻尼器用 100 mm 长的管线 (0.12 mm 内径) 旁路连接, 程序设置通过旁路 (进样命令 0.1 分钟后; 见下面的 WPS 参数), 压缩性设置采用: A = 35, B = 80

流速: 2.1 mm 内径柱采用 0.42 mL/min; 3.0 mm 内径为 0.85 mL/min; 4.6 mm 内径为 2.00 mL/min

梯度时间表:	时间 (分钟)	%B
	0.0	2.0
	1.0	2.0
	7.0	57.0
	7.1	100.0
	8.4	100.0
	8.6	2.0
	停止时间 8.7	

DAD: PW 0.01 分钟; 狭缝 4 nM; 停止时间 7 min (根据应用调整); 流通池体积 = 5 μ l, 6 mm 光程 (安捷伦部件号 G1315-60025)

信号 A: 338, 10 nm; 参比 390, 20 nm

信号 B: 262, 16 nm; 参比 324, 8 nm

信号 C: 338, 10 nm; 参比 390, 20 nm

信号 D: 230, 16 nm; 参比 360, 100 nmM

表 2. 低灵敏度氨基酸标准溶液的配制 (按下表步骤稀释样品, 配制三种低灵敏度标准溶液)

	氨基酸溶液的最终浓度 (pMoles/ μ L)		
	900	225	90
取 5 mL 18 nMoles EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1 N HCl 稀释		15 mL	45 mL
稀释的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
取 5 mL 稀释的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nMoles 内标溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-内标混合液	10 mL	10 mL	10 mL
取 100 μ L EAA - 内标混合液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
加入 1000 pMoles AA 标准溶液	900 μ L	—	—
加入 250 pMoles AA 标准溶液	—	900 μ L	—
加入 100 pMoles AA 标准溶液	—	—	900 μ L
含 EAA 和 500 pMoles/μL 内标的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

信号时间表 C): 0.00 分钟 338, 10 nm; 参比 390, 20 nm; 5.53 min 262, 16 nm; 参比 324, 8 nm (根据需要调整; 3.0 mm 内径柱大约 5.45 分钟时切换, 4.6 mm 内径柱大约 5.4 分钟切换)

FLD: PW 0.01 分钟; 停止时间 7 分钟 (根据需要调整), 流通池易碎, 千万不要将这种检测器串联在其它检测器之前 Ex 230 nm; Em 450 nm; 滤光片 295 nm (默认滤光片) 信号时间表: 0.00 分钟 Ex 230 nm, Em 450 nm, PMT Gain 9 (根据需要) 5.53 分钟 Ex 266 nm, Em 305 nm; PMT Gain 9 (根据需要, 波长切换时间见 DAD, 约增加 0.03 分钟)

TCC: 使用时安装低扩散组件; 柱子一侧 T = 40 $^{\circ}$ C, 出口侧 30 $^{\circ}$ C。两侧都使用低扩散组件。

WPS: 默认体积设置为 0.5 μ l, 进样器程序中均采用默认进样速度 200 μ l/min

进样器程序

- 1) 从硼酸盐瓶 (安捷伦部件号 5061-3339) 中吸取 2.5 μ l
- 2) 从样品瓶中吸取 0.5 μ l
- 3) 在清洗口 5X 混合 3 μ l
- 4) 等待 0.2 分钟
- 5) 从 OPA 瓶 (安捷伦部件号 5061-3335) 中吸取 0.5 μ l
- 6) 在清洗口 6X 混合 3.5 μ l
- 7) 从 FMOC 瓶 (安捷伦部件号 5061-3337) 中吸取 0.4 μ l
- 8) 在清洗口 10X 混合 3.9 μ l
- 9) 从进样稀释液瓶中吸取 32 μ l
- 10) 在清洗口 8X 混合 20 μ l
- 11) 进样
- 12) 等待 0.10 分钟
- 13) 不通过阀

表 3. 高灵敏度氨基酸标准溶液的配制（按下表所示配制三种高灵敏度标准溶液）

	氨基酸溶液的最终浓度(pMoles/ μ L)		
	90	22.5	9
取 5 mL 1.8 nMoles EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用 0.1 N HCl 稀释	—	15 mL	45 mL
稀释的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
取 5 mL 稀释的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nMoles 内标溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-内标混合液	10 mL	10 mL	10 mL
取 100 μ L EAA-内标混合液	100 μ L	100 μ L	100 μ L
加入 100 pMoles AA 标准溶液	900 μ L	—	—
加入 25 pMoles AA 标准溶液	—	900 μ L	—
加入 10 pMoles AA 标准溶液	—	—	900 μ L
含 EAA 和 50 pMoles/μL 内标的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

用于绘制校正曲线的氨基酸混合液

为了建立校正表和校正曲线，将 17 种氨基酸加上 4 种扩展氨基酸组合在一起，配制成各种浓度氨基酸的混合物溶液，内标的量一定。内标(IS)（正缬氨酸和肌氨酸）是氨基酸辅助试剂盒（部件号 5062-2478）的一部分。这个试剂盒里的其它氨基酸（谷氨酰胺[GLN]、天门冬酰胺[ASN]、色氨酸[TRP]和羟脯氨酸[HYP]）组成了扩展氨基酸(EAA)。参见表 2 和表 3，分别配制成相应的低和高灵敏度溶液。

氨基酸标准溶液（10 pMoles/ μ L 到 1 nMoles/ μ L）：

将各 1-mL 安瓿的标样（部件号从 5061-3330 到 5061-3334）分成每份 100- μ L，置锥形内插管中，加盖，4 °C 冷藏保存。根据实验需要，校正曲线可以用 2 到 5 种标准品制成。

扩展氨基酸(EAA)储备液：

该溶液是用氨基酸辅助试剂盒（部件号 5062-2478）中 6 种氨基酸中的 4 种配制的。最终浓度为含 18 nMoles/ μ L 谷氨酰胺、天门冬酰胺、色氨酸和 4-羟基脯氨酸的 25 mL 去离子水溶液，用做低灵敏度标准溶液（表 2）。超声振荡使其溶解。4 °C 下保存。将 5 mL，18 nMoles/ μ L 标样用 45 mL 去离子水稀释，配成 1.8 nMoles/ μ L 的溶液，用做高灵敏度标准溶液（表 3）。

内标储备液：该溶液是用氨基酸辅助试剂盒（部件号 5062-2478）中 6 种氨基酸中的 2 种配制的。最终浓度为含 10 nMoles/ μ L 正缬氨酸和肌氨酸的 25-mL 去离子水溶液，用做低灵敏度内标（表 2）。超声振荡使其溶解，在冰箱中保存(4 °C)。将 5 mL，10 nMoles/ μ L 标准溶液用 45 mL 去离子水稀释，配成 1 nMoles/ μ L 溶液，用做高灵敏度标准（表 3）内标，4 °C 下保存。

HPLC 柱

ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m, 部件号 959741-902
 ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 3.0 x 50 mm, 1.8 μ m, 部件号 959941-302
 ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μ m, 部件号 959941-902

流动相和进样稀释液

流动相 A：10 mM Na₂HPO₄; 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2: 0.5 mM NaN₃（5.6 克无水 Na₂HPO₄ + 15.2 克 Na₂B₄O₇ · 10H₂O 溶于 4 L 水 + 32 mg NaN₃）。用 6 mL 浓盐酸将 pH 粗调至 9 左右，然后进一步调至 pH 8.2。**使用强酸时需小心。**用 0.45 μ m 再生纤维素膜过滤（安捷伦部件号 3150-0576）。在室温下约 1.5 周内稳定。

流动相 B：乙腈：甲醇：水（45:45:10，体积比）。所有流动相溶剂必须为 HPLC 级。

进样稀释液：100 ml 流动相 A + 1, 500 μ L 浓 H₃PO₄ 置于 100-mL 瓶中。4 °C 保存。用前分装至 6-mL 样品瓶中。**使用强酸时需小心。**

氨基酸分析所用的所有消耗品名称和部件号见订购信息。

衍生化试剂

硼酸盐缓冲液：安捷伦部件号 5061-3339
 0.4 N 水溶液，pH 10.2。4 °C 保存。必要时可分装。

FMOC 试剂：

安捷伦部件号 5061-3337
 从 1-mL FMOC 试剂中吸取每份 200- μ L，置锥形内插管中，立刻加盖，冷藏(4 °C)；分装后如保存在 4 °C，最多 7 到 10 天内可用；如在室温下保存，1 天内可用。

OPA 试剂: 安捷伦部件号 5061-3335

从 1-mL OPA 试剂中吸取每份 200- μ L, 置锥形内插管中, 立刻加盖, 冷藏(4 °C); 分装后如保存在 4 °C, 最多 7 到 10 天内可用; 如在室温下保存, 1 天内可用。

水: 去离子水, HPLC 级。

氨基酸分析所用的所有消耗品名称和部件号见 [订购信息](#)。

样品制备

本文所分析的各种瓶装啤酒样品从当地获得。制备时只需简单的超声脱气。由于碳酸饮料超声时可能引起瞬间爆炸, 操作时必须小心。建议将啤酒倒入比其体积大得多的广口烧杯中, 以便容纳产生的大量泡沫。

结果与讨论

分离条件的选择

在本应用中, 我们采用了新的方法, 使氨基酸分析可以在范围更广泛的色谱柱上进行。我们报告的结果是在快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱上得到的, 这些 4.6-、3.0-和 2.1-mm 内径柱的填料粒径都是 1.8- μ m, 柱长都是 50-mm。每个方法的唯一区别是流速, 从而可以保持相同的线速度、检测器波长切换时间, 这样, 二级氨基酸可以包含在同一个的色谱图中。

我们也用快速分离高通量 Eclipse Plus C8 柱和快速分离高通量 Eclipse XDB-C18 柱与 C8 柱上进行了分离, 这些柱子都填充了 1.8- μ m 填料, 规格也相同 (本文未给出数据)。所有柱子都得到了与快速分离高通量

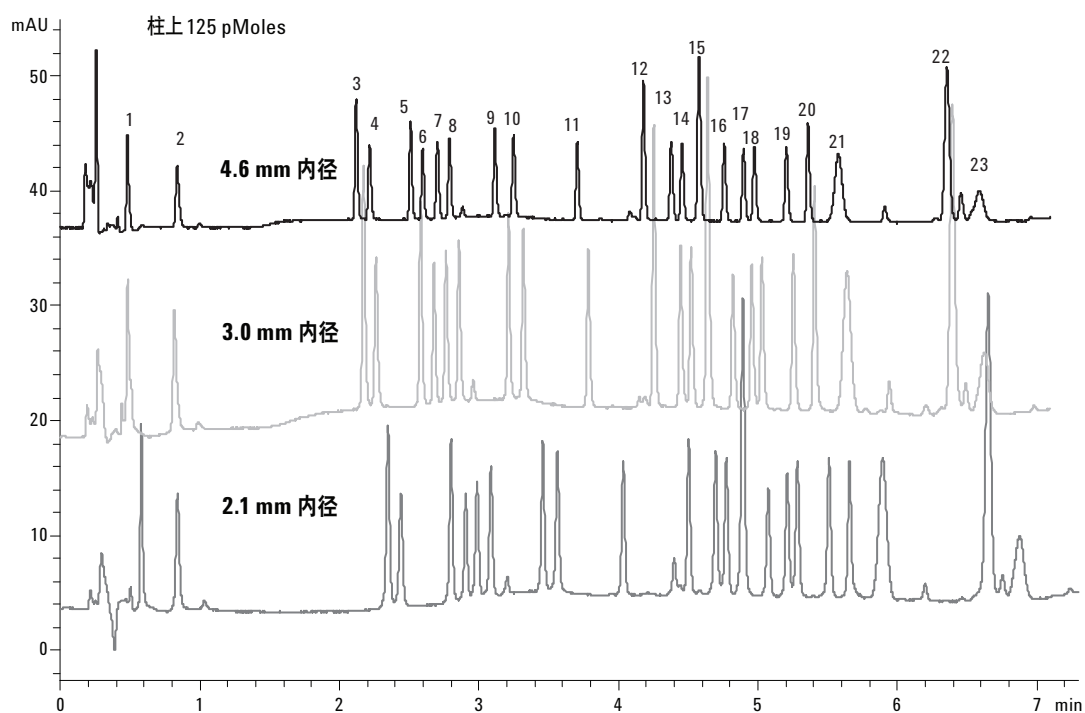


图 3. 用各种不同内径快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 50 mm 长, 1.8- μ m 粒径色谱柱进行氨基酸分析, DAD 检测

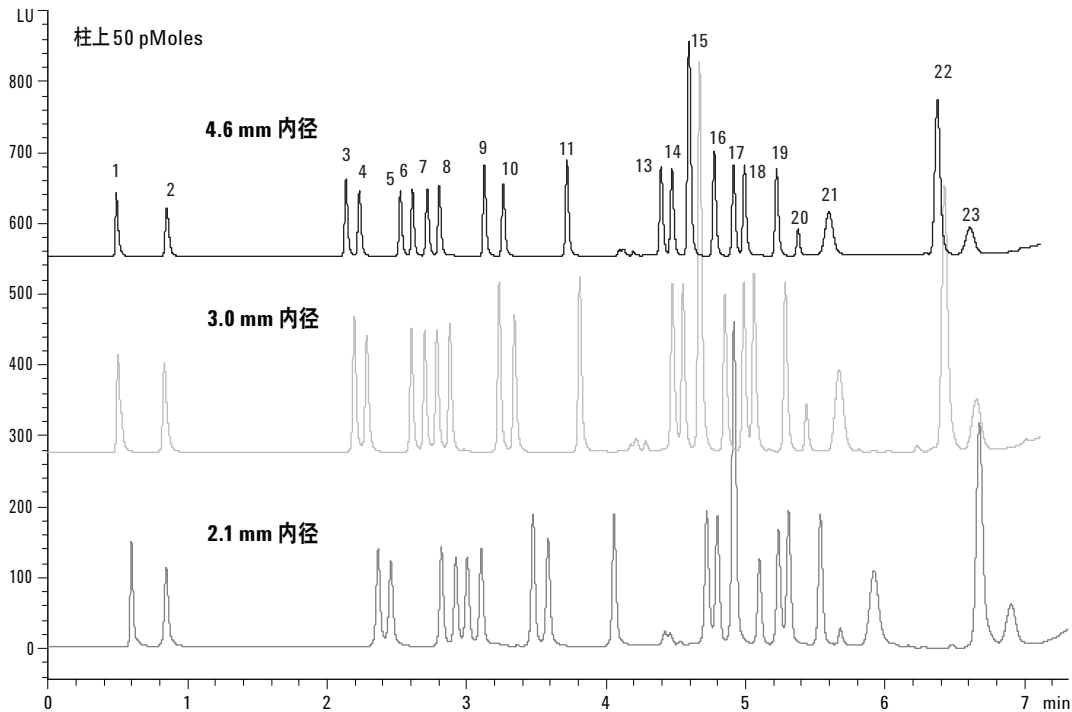


图4. 用各种不同内径快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 50 mm 长, 1.8- μ m 粒径色谱柱进行氨基酸分析, FLD 检测

Eclipse Plus C18 柱非常相似的结果 (本文未给出数据)。在不同尺寸快速分离高通量 Eclipse Plus C18 柱上得到的相应的分离结果见图 3 和图 4, 分别为 DAD 和 FLD 检测。可以看出, 不管用哪种规格的色谱柱, 所有色谱图的保留时间只有微小的变化。这些变化是由三种不同尺寸柱子延迟时间的微小差异造成的。因为延迟体积是恒定的, 所以流速越高延迟时间越短。

重复性和线性

在以前的这类分析中, 二级氨基酸的重复性总是比一级氨基酸差[1-4]。本文报道的方法中, 我们提高了二级氨基酸的重复性, 使其与一级氨基酸相当。在 ZORBAX Eclipse Plus-C18, 2.1-mm 内径柱上分析所得到的相关数据见表 4 和表 5 (不带内标), 4.6-mm 内径柱见表 6 (带内标)。表 4 中的绝对峰面积重复性好, 所有氨基酸的平均 RSD 低于 2%, 只有 2 个在 3% 以上。请注意, 表 5 和表 6 中显示所有氨基酸的线性也非常好, 所有氨基酸 R^2 都接近 1.00, 加内标的要更好一些。用 Eclipse Plus-C18, 3.0-mm 内径柱不加内标的分析结果见图 5 和图 6。图 7 可见在 Eclipse Plus-C18, 2.1 内径柱上进行低浓度氨基酸分析 (柱上 5.0 pMoles) 的色谱重复性。上下重叠的图谱可以很容易地比较保留时间的重复性和色谱峰大小。这些是原始数据, 没有校正, 也没加内标。

表 4. 用 Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8- μ m 色谱柱, 不加内标的绝对峰面积重复性

检测器重复性		FLD	DAD
50 pMoles FLD; 125 pMoles DAD; 原始数据峰面积		RSD	RSD
氨基酸名称	缩写	(n = 10)	(n = 12)
天门冬氨酸	ASP	1.1	0.8
谷氨酸	GLU	0.8	2.3
天门冬酰胺	ASN†	1†	1.6†
丝氨酸	SER	0.9	1
谷氨酰胺	GLN*	2.9*	2.1*
组氨酸	HIS	0.8	2.1
甘氨酸	GLY	1	1.4
苏氨酸	THR	1.2	0.9
精氨酸	ARG	1	1.9
丙氨酸	ALA	0.9	.3
酪氨酸	TYR	1	1
胱氨酸	CYS-CYS	NA	1.1
缬氨酸	VAL	1.5	0.9
蛋氨酸	MET	2.7	0.8
正缬氨酸	NVA	3.3	2.3
色氨酸	TRP	1.3	1.1
苯丙氨酸	PHE	1	0.9
异亮氨酸	ILE	0.9	1.5
亮氨酸	LEU	2.1	0.7
赖氨酸	LYS	4.4	0.8
羟脯氨酸	HPA	1.8	1.7
肌氨酸	SAR	1.9	2.3
脯氨酸	PRO	3.0	2.2
平均 RSD =		1.7	1.4

† 天门冬酰胺在溶液中不太稳定

* 谷氨酰胺在溶液中非常不稳定

表 5. Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8- μ m 色谱柱上, 不加内标进行氨基酸分析的线性

氨基酸	用峰面积原始数据	
	DAD 线性相关系数(r^2)	FLD 线性相关系数(r^2)
ASP	0.9949	0.9992
GLU	0.9976	0.9995
ASN†	0.9928†	1.0000†
SER	0.9933	0.9997
GLN*	0.9966*	0.9937*
HIS	0.9951	0.9996
GLY	0.9931	0.9996
THR	0.9942	0.9996
ARG	0.9960	0.9998
ALA	0.9965	0.9996
TYR	0.9936	0.9997
CYS-CYS	0.9818	NA
VAL	0.9952	0.9998
MET	0.9944	0.9997
NVA	0.9989	0.9991
TRP	0.9923	0.9987
PHE	0.9925	0.9996
ILE	0.9934	0.9993
LEU	0.9944	0.9994
LYS	0.9857	0.9957
HYP	0.9980	0.9924
SAR	0.9975	0.9960
PRO	0.9981	0.9969

†天门冬酰胺在溶液中不太稳定
*谷氨酰胺在溶液中非常不稳定

表 6. Agilent 1200SL HPLC 系统在快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm, 1.8- μ m 色谱柱上, 加内标进行氨基酸分析的线性

氨基酸	用峰面积原始数据	
	DAD 线性相关系数(r^2)	FLD 线性相关系数(r^2)
ASP	0.99995	0.99887
GLU	0.99916	0.99879
ASN†	1.00000†	0.99581†
SER	0.99982	0.99880
GLN*	0.99996*	0.99549*
HIS	0.99978	0.99993
GLY	0.99982	0.99681
THR	0.99996	0.99941
ARG	0.99993	0.99946
ALA	0.99984	0.99924
TYR	0.99991	0.99946
CYS-CYS	0.99992	NA
VAL	0.99992	0.99886
MET	0.99992	0.99996
NVA	IS+	IS+
TRP	0.99997	0.99687
PHE	0.99988	0.99943
ILE	0.99973	0.99910
LEU	0.99986	0.99932
LYS	0.99956	0.99979
HYP	0.99991	0.99751
SAR	IS+	IS+
PRO	0.99998	0.99979

†天门冬酰胺在溶液中不太稳定
*谷氨酰胺在溶液中非常不稳定
+DAD 检测时内标的柱上浓度为 250 pMole, FLD 检测时内标的柱上浓度为 25 pMole

扩展氨基酸(EAA)和内标(IS)

有几种氨基酸在蛋白质酸水解过程中会被破坏(天门冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸), 还有一种氨基酸除了结构蛋白(羟脯氨酸)外, 在其它地方几乎不存在。此外, 许多分析人员愿意在样品中使用内标, 以改善准确度和重复性。为了得到最好的结果, 需要谨慎选择内标。通常在下列两种样品处理步骤中加入内标:

1. 在进行任何样品处理之前加到样品中(如, 酸水解之前)。它将校正可能发生的所有改变, 当然,

内标应对水解稳定, 并与样品中的其它组分进行相同的衍生化反应。为了正确地使用这种方法, 标准品也应该水解; 但这通常会带来更多的变数, 因为各种氨基酸的稳定性不同。丝氨酸就是一个例子, 它随着水解时间的延长逐渐被破坏。因此使用内标非常有用。

2. 仅在分析前加入, 将校正体积量取误差和自动进样器的偏差, 同样假设内标和样品组分具有同样的反应性。本应用中采用的是这种方法。

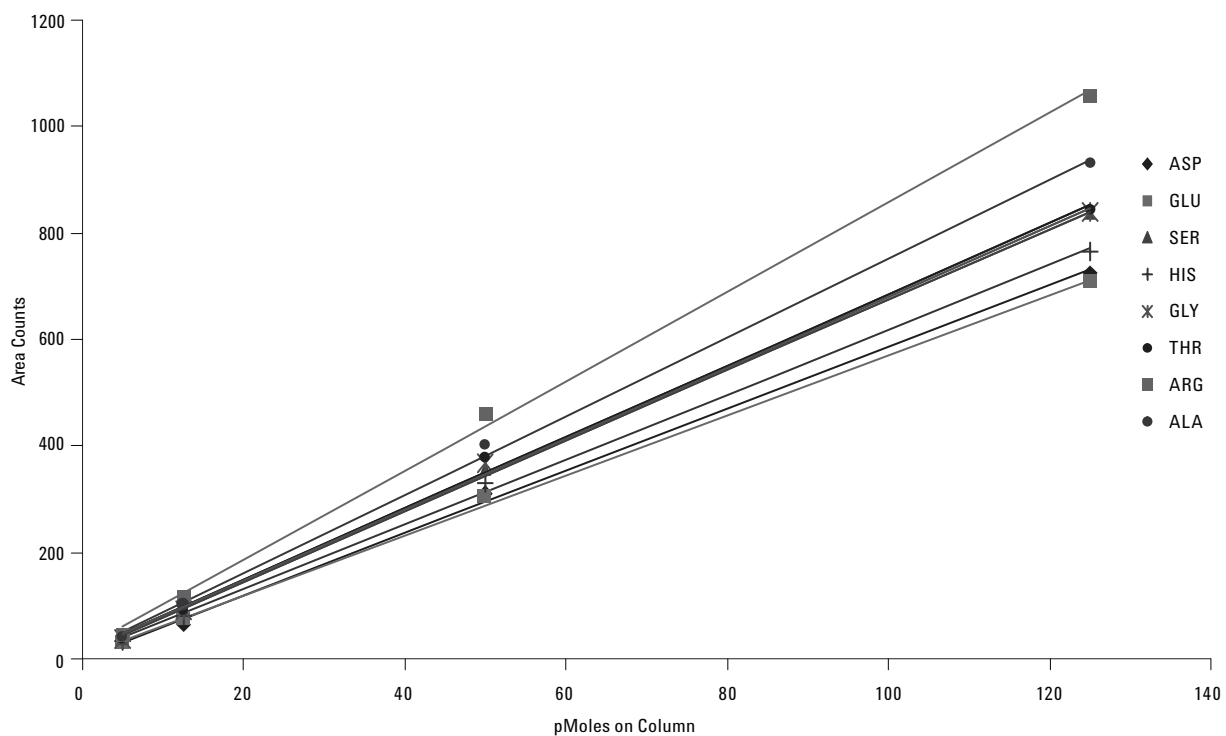


图5. 在快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 3.0 x 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱上, 用FLD检测的氨基酸线性

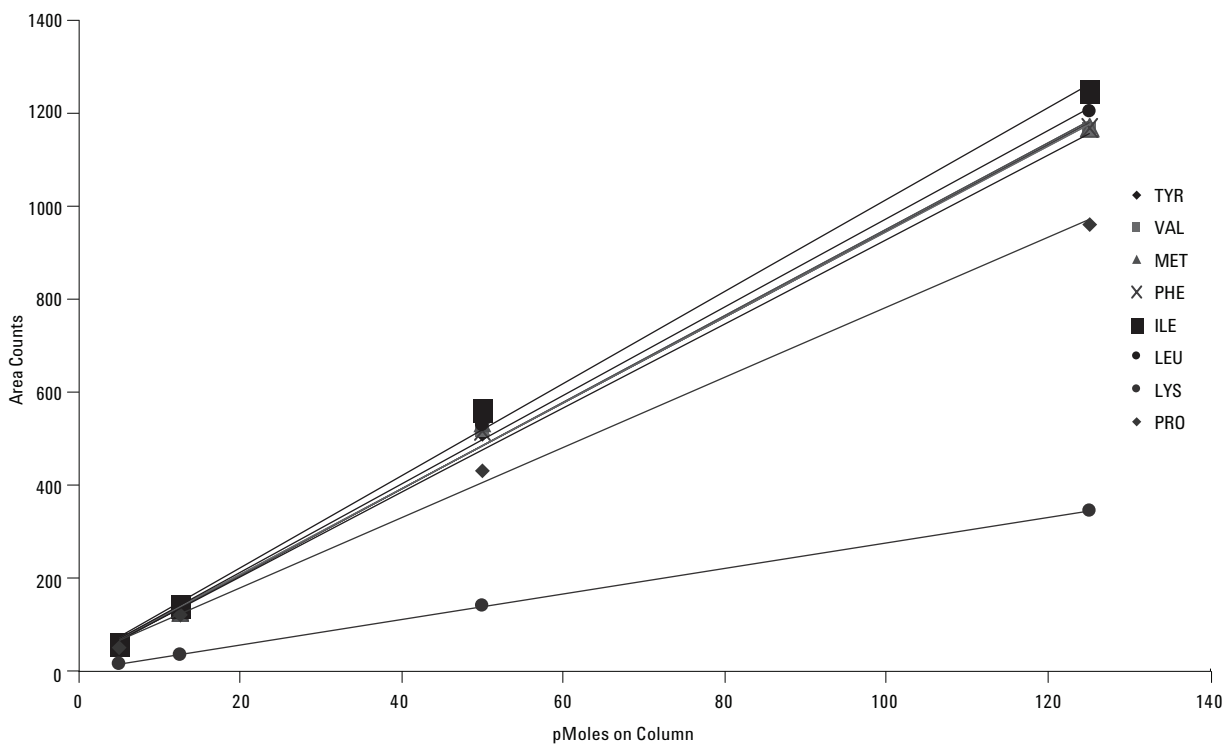


图6. 在快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 3.0 x 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱上, 用FLD检测的氨基酸线性

这里报道的 OPA/FMOC 分析中，可以使用两种内标：一级氨基酸用正缬氨酸，二级氨基酸用肌氨酸。两种方法都可以用这些氨基酸作为内标（未列出数据），但方法 2 肯定是首选方法。上述 4 种氨基酸(EAA)都包含在安捷伦氨基酸辅助试剂盒(P/N 5062-2478)的标准品内。这些氨基酸用本文介绍的氨基酸分析新方法都可以完全分离。在快速分离高通量 Eclipse Plus C18,

2.1, 3.0, 或 4.6 x 50 mm, 1.8- μ m 色谱柱上的分离见图 3 和图 4。这两张图都包含内标正缬氨酸和肌氨酸，FLD 色谱图中的柱上浓度是 100 pMole，DAD 的柱上浓度是 250 pMole，图中均有显示。添加 EAA 和内标的步骤已有报道[4]。这一步骤可用于绘制实际样品定量分析的内标校正表。这一步骤在实验部分已做介绍，并列于表 2 和表 3 中。

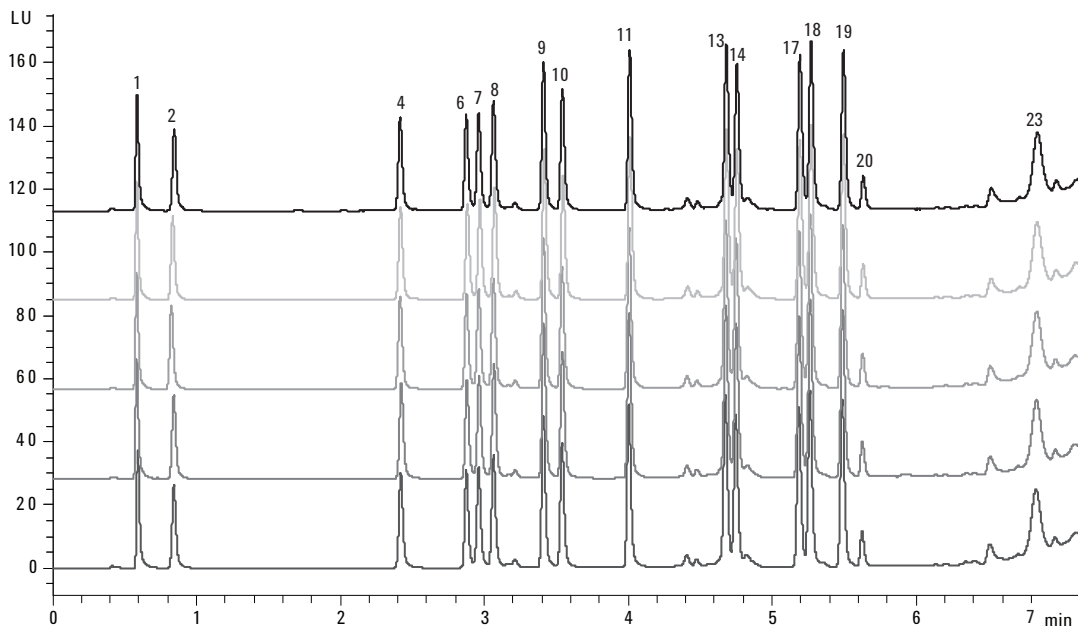


图 7. 快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱, FLD 检测, 不加内标柱上 5.0 pMole 氨基酸分析的重复性

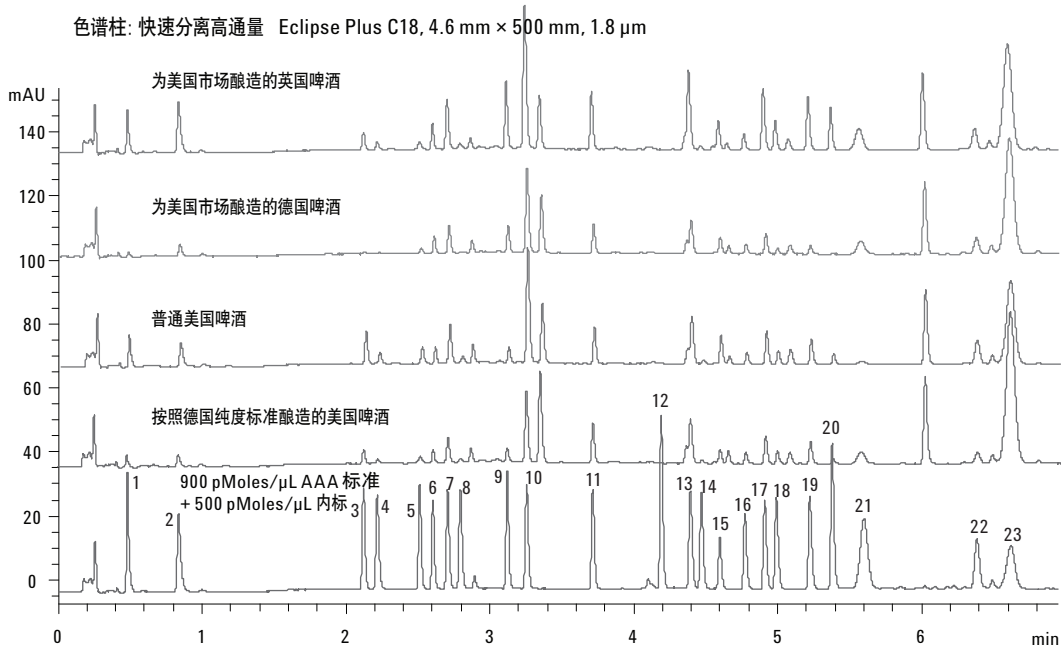


图 8. 用 1200 SL 系统, DAD 检测, 加内标比较美国市场上的各种啤酒

实际样品

图8显示了各种窖装啤酒的比较结果。每种啤酒中均加入了500 pMoles/ μ L的内标，从而可以比较计算出的相对氨基酸含量。比较结果显示，这些啤酒的相对氨基酸含量与人们感觉并不一致，人们认为“普通”美国啤酒的氨基酸含量比传统德国啤酒要低。结果显示，至少有一些德国和英国啤酒生产商现在酿造符合美国口味的啤酒销往美国。有可能这种美国的微酿啤

酒与为德国销售酿造的啤酒更一致，因为它的酿造符合德国纯度标准，因此，“传统的”德国酿造更有代表性。结果列于表7。

酸水解和后续的氨基酸分析在蛋白质分析中普遍使用。在实验室和目前生物技术和制药公司都在执行的新的过程分析技术(PAT)中，也对细胞培养基进行监测。有关这些领域氨基酸分析的文章将随后发表。

表7. 各种啤酒氨基酸含量的比较

氨基酸	普通美国啤酒 μ Moles / mL	按照德国纯度标准 酿造的美国啤酒 μ Moles / mL	为美国市场酿造的 德国啤酒 μ Moles / mL	为美国市场酿造的 英国啤酒 μ Moles / mL
ASP	1.06	0.73	0.26	1.15
GLU	1.07	0.93	0.80	1.98
ASN	1.19	0.98	0.14	0.54
SER	0.45	0.40	0.12	0.26
GLN	0.67	0.76	0.38	0.33
HIS	0.68	1.00	1.07	0.89
GLY	1.54	2.00	1.61	1.57
THR	0.30	0.34	0.74	0.20
ARG	0.48	0.94	1.29	1.83
ALA	4.28	5.14	4.56	4.60
TYR	1.36	2.86	1.65	1.77
CYS-CYS	0.08	0.10	0.08	0.05
VAL	1.92	3.35	1.93	2.83
MET	0.17	0.27	0.11	0.16
NVA	IS	IS	IS	IS
TRP	0.58	1.07	0.80	0.67
PHE	1.33	2.21	1.23	2.07
ILE	0.54	0.97	0.34	0.94
LEU	1.02	1.71	0.55	1.75
LYS	0.30	0.32	0.08	0.90
HYP	0.20	1.74	1.17	1.26
SAR	IS	IS	IS	IS
PRO	8.65	34.84	15.88	10.29
合计 =	27.9	62.7	34.8	36.0

结论

本工作对氨基酸分析方法进行了各方面的改进。使用 1.8- μm 粒径色谱柱可使分析周期缩短一半，从 35 分钟左右缩短到 13.5 分钟左右。最早洗脱的天门冬氨酸和谷氨酸的峰形都得到了改善。提高了二级氨基酸，以及反应最慢的氨基酸，如赖氨酸的重复性。线性良好 (r^2 接近 1)，平均峰面积重复性低于 2%。报道了各种内径（从 2.1 到 4.6 mm）的新快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 1.8- μm 柱的使用。新的流动相和进样器条件非常简单，只要简单地改变流速就可以在 2.1-到 3.0-或 4.6-mm 内径柱之间进行转换。也可以使用快速分离高通量 Eclipse Plus C8 或快速分离高通量 Eclipse XDB-C18 或-C8 柱（数据未显示）。

参考文献

1. Rainer Schuster and Alex Apfel, Hewlett-Packard App. Note, **5954-6257** (1986)
2. Rainer Schuster, *J. Chromatogr.*, **431**, 271-284 (1988)
3. Herbert Godel, Petra Seitz, and Martin Verhoef, *LC-GC International*, **5(2)**, 44-49 (1992)
4. John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward, Agilent App. Note, **5980-1193E** (2000)
5. S. Moore and W.H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951)
6. M. Roth, *Anal Chem*, **43**, 880-882 (1971)
7. S.B. Einarsson, B. Josefsson, and S. Lagerkvist, *J. Chromatogr.*, **282**, 609-618 (1983)
8. I. Betnér and P. Földi, *LC-GC International*, **2(3)**, 44-53 (1989)
9. B. Gustavsson and I. Betnér, *J. Chromatogr.*, **507**, 67-77 (1990)

更多信息

如果需要了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18 HPLC 柱

说明	尺寸 (mm)	粒径 (μm)	安捷伦部件号
Eclipse Plus C18	4.6 x 50 mm	1.8 μm	959941-902
Eclipse Plus C18	3.0 x 50 mm	1.8 μm	959941-302
Eclipse Plus C18	2.1 x 50 mm	1.8 μm	959741-902

衍生化试剂

说明	安捷伦部件号
硼酸盐缓冲液 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	5061-3337
OPA 试剂, 10 mg/mL 溶于 0.4 M 硼酸盐缓冲液 和 3-mercaptoproprionic acid, 6 x 1 mL 安瓿	5061-3335
用于半胱氨酸分析的 DTDPA 试剂, 5 g	5062-2479

流动相和进样稀释液成分

说明	厂商	厂商部件号
Na_2HPO_4 , 无水磷酸氢二钠	Sigma	71639
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 硼砂	Sigma	S 9640
NaN_3 , 叠氮钠	Sigma	S 2002
H_3PO_4 , 磷酸	Sigma	79617

样品瓶

说明	安捷伦部件号
100- μL 带聚合物支脚的锥形内插管, 100/pk	5181-1270
棕色, 广口, 带书写标签的螺口样品瓶, 2 mL, 100/pk	5182-0716
蓝色聚丙烯盖, PTFE/硅树脂隔垫, 100/pk	5182-0721
透明玻璃螺纹口样品瓶, 6 mL, 16 mm 盖, 100/pk	9301-1377
螺纹盖, 16 mm, 100/pk	9301-1379
PTFE/硅树脂隔垫, 16 mm, 100/pk	9301-1378

氨基酸标样

说明	安捷伦部件号
氨基酸标准溶于 0.1 M HCl, 10 x 1 mL 安瓿	
1 nMoles/ μL	5061-3330
250 pMoles/ μL	5061-3331
100 pMoles/ μL	5061-3332
25 pMoles/ μL	5061-3333
10 pMoles/ μL	5061-3334
氨基酸辅助试剂盒: Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp, 各 1 g	5062-2478

安捷伦对本材料中的错误，以及与设备、性能或本品的使用相关的意外伤害或由此造成的损坏不承担任何责任。

本文中的信息，说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2007

2007年2月中国印刷
5989-6297CHCN