

# 使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱 分析在线衍生氨基酸

## 作者

陆予菲  
安捷伦科技公司

## 摘要

本文开发出一种能够对氨基酸进行快速和高分析灵敏度定量分析的液相色谱 (LC) 方法。此方法采用安捷伦自动进样器与填充表面多孔颗粒填料的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱进行自动化在线柱前氨基酸衍生与色谱分离，成功应用于在三种不同样品基质中对 23 种氨基酸进行液相色谱分离与精确测定。

## 前言

氨基酸分析历来都是色谱分析中的难点，在食品、制药和生物等行业中有广泛应用。如何高效地分析不同种类的氨基酸，是许多分析化学工作者面临的问题。许多市场上的方法均存在缺陷，如色谱柱在高 pH 下寿命短、分析效率低、稀有试剂不易获取等。

本文开发出的液相色谱方法，可实现氨基酸的高分析速度和高分辨率定量分析。此方法采用可靠的在线柱前氨基酸衍生，结合填充表面多孔颗粒填料的 Agilent AdvanceBio AAA C18 色谱柱进行色谱分离。使用安捷伦自动进样器可轻松实现自动化在线衍生，其中一级氨基酸用邻苯二甲醛 (OPA) 进行衍生，二级氨基酸用 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 进行衍生。本分析所需的所有试剂和氨基酸标准品均来自 AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒。

## 实验部分

### 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪，配备下列安捷伦组件：

- G1312B 二元泵
- G1367D 液体自动进样器
- G1316A 柱温箱
- G4212B 二极管阵列检测器

本实验选用的色谱柱为 Agilent AdvanceBio AAA C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 655950-802)。

甲醇和乙腈为色谱纯，购自迪马科技公司。盐酸、磷酸氢二钠和硼酸钠为分析纯，购自百灵威科技公司。实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统制得的超纯去离子水。23 种氨基酸参比标样 (表 1)、OPA、FMOC 和硼酸盐缓冲液来自安捷伦科技公司的 AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒。样品包括复方氨基酸注射液、复方氨基酸片和山羊乳，均购自当地的药店和超市。

### 氨基酸标准溶液的配制

将 1 mL 安瓿瓶装的 250 pmol/μL 氨基酸标准品平均分装成 10 份，每份 100 μL。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶，在 4 °C 下储存。

从氨基酸补充剂试剂盒中准确称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.0 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺和 91.95 mg 色氨酸。然后将这些氨基酸加入 25 mL 容量瓶中，再加入 12.5 mL 0.1 M 盐酸溶液，超声直至氨基酸溶解。然后用水稀释至刻度，摇匀，并作为氨基酸补充剂储备液 1 在 4 °C 下储存。

从氨基酸补充剂试剂盒中准确称取 58.58 mg 正缬氨酸和 44.54 mg 肌氨酸，将其加入 50 mL 容量瓶中。然后向容量瓶中加入 25 mL 0.1 M 盐酸溶液，超声至氨基酸溶解。然后用水稀释至刻度，摇匀，并作为氨基酸补充剂储备液 2 在 4 °C 下储存。此溶液可作为内标溶液使用。

取适量氨基酸补充剂储备液 1 和 2，加入分装的各氨基酸标准品中，并用涡旋振荡仪将其混匀；贴氨基酸标准溶液标签，待用。

## 衍生化试剂的配制

**FMOC 试剂:** 将 1 mL 安瓿瓶装的 FMOC 平均分装成 10 份, 每份 100  $\mu$ L。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶, 在 4  $^{\circ}$ C 下储存。在该储存条件下, 分装的溶液可在 7-10 天保持稳定。

**OPA 试剂:** 将 1 mL 安瓿瓶装的 OPA 平均分装成 10 份, 每份 100  $\mu$ L。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶, 在 4  $^{\circ}$ C 下储存。在该储存条件下, 分装的溶液可在 7-10 天保持稳定。

**稀释剂:** 100 mL 流动相 A (含 1.2 mL 磷酸), 4  $^{\circ}$ C 下储存。

## 样品前处理

**复方氨基酸注射液:** 取 1 mL 样品溶液, 置于 50 mL 容量瓶中。然后, 加入 25 mL 0.1 M 盐酸溶液, 摇匀, 加水稀释至刻度, 并再次摇匀。使混合物通过 0.2  $\mu$ m 滤膜, 保存续滤液, 待用。

**复方氨基酸片:** 取 5 片样品, 研匀, 然后准确称取相当于 1 片量的细粉。将粉末置于 15 mL 离心管中, 加入 0.1 M 盐酸溶液, 超声至粉末溶解。然后, 使溶液通过 0.2  $\mu$ m 滤膜。取续滤液 1 mL, 加入 50 mL 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 待用。

**山羊乳:** 参考乳制品国家标准 GB/T 5009.124-2003 配制。简言之, 用 HCl 使山羊乳中的蛋白质变性, 在高温下水解为氨基酸, 经过滤和干燥后, 重悬于柠檬酸钠缓冲液中。

## 自动进样器程序

- 吸取 2.5  $\mu$ L 硼酸盐缓冲液
- 吸取 1.0  $\mu$ L 样品
- 在清洗口将 3.5  $\mu$ L 混合液混合 5 次
- 等待 0.2 分钟, 然后吸取 0.5  $\mu$ L OPA
- 在清洗口将 4  $\mu$ L 混合液混合 10 次
- 吸取 0.4  $\mu$ L FMOC
- 在清洗口将 4.4  $\mu$ L 混合液混合 10 次
- 吸取 32  $\mu$ L 稀释剂
- 在清洗口将 20  $\mu$ L 混合液混合 8 次
- 进样
- 等待 0.1 分钟
- 阀切换至旁路

## 液相色谱条件

参数	值																
色谱柱	AdvanceBio AAA C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu$ m																
流速	1.5 mL/min																
柱温	40 $^{\circ}$ C																
流动相	A) 10 mmol/L 磷酸氢二钠和 10 mM 硼酸钠溶液, 用盐酸将 pH 调节为 8.2 B) 甲醇:乙腈:水, 45:45:10 (v:v)																
梯度程序	<table><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>2</td></tr><tr><td>0.35</td><td>2</td></tr><tr><td>13.4</td><td>57</td></tr><tr><td>13.5</td><td>100</td></tr><tr><td>15.7</td><td>100</td></tr><tr><td>15.8</td><td>2</td></tr><tr><td>18.0</td><td>2</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0.0	2	0.35	2	13.4	57	13.5	100	15.7	100	15.8	2	18.0	2
时间 (min)	%B																
0.0	2																
0.35	2																
13.4	57																
13.5	100																
15.7	100																
15.8	2																
18.0	2																
检测器	338 nm, 带宽 10 nm; 参比 390 nm, 带宽 20 nm (一级氨基酸) 262 nm, 带宽 16 nm; 参比 324 nm, 带宽 8 nm (二级氨基酸) 在赖氨酸出峰后切换波长 实验设置: 在 10.0 分钟时, 从 338 nm 切换为 262 nm																

## 结果与讨论

按照本报告所述的进样程序进行氨基酸样品的在线衍生进样。利用配备 AdvanceBio AAA 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统在 18 分钟内对 23 种氨基酸实现了基线分离，图 1 和表 1 示出氨基酸标准溶液的色谱图以及图中涉及的 23 种氨基

酸列表。本报告所述分析方法为在原有方法<sup>1,2</sup>的基础上，采用 Poroshell HPH-C18 色谱柱开发的方法。由于未改变色谱柱选择性，氨基酸的出峰顺序也不变。赖氨酸与羟脯氨酸之间有 0.1 分钟的间隔，因此波长切换对化合物的分析没有影响。

采用本报告所述的方法对实际样品中的氨基酸进行测定，结果如图 2-4 所示。实际样品中的氨基酸均实现了完全的基线分离。该方法可成功测定复方氨基酸注射液中的 18 种氨基酸、复方氨基酸片中的 17 种氨基酸以及乳制品中的 16 种氨基酸。

表 1. 23 种氨基酸标准品列表

峰号	氨基酸	峰号	氨基酸
1.	天冬氨酸	13.	缬氨酸
2.	谷氨酸	14.	甲硫氨酸
3.	天冬酰胺	15.	正缬氨酸
4.	丝氨酸	16.	色氨酸
5.	谷氨酰胺	17.	苯丙氨酸
6.	组氨酸	18.	异亮氨酸
7.	甘氨酸	19.	亮氨酸
8.	苏氨酸	20.	赖氨酸
9.	精氨酸	21.	羟脯氨酸
10.	丙氨酸	22.	肌氨酸
11.	酪氨酸	23.	脯氨酸
12.	胱氨酸		

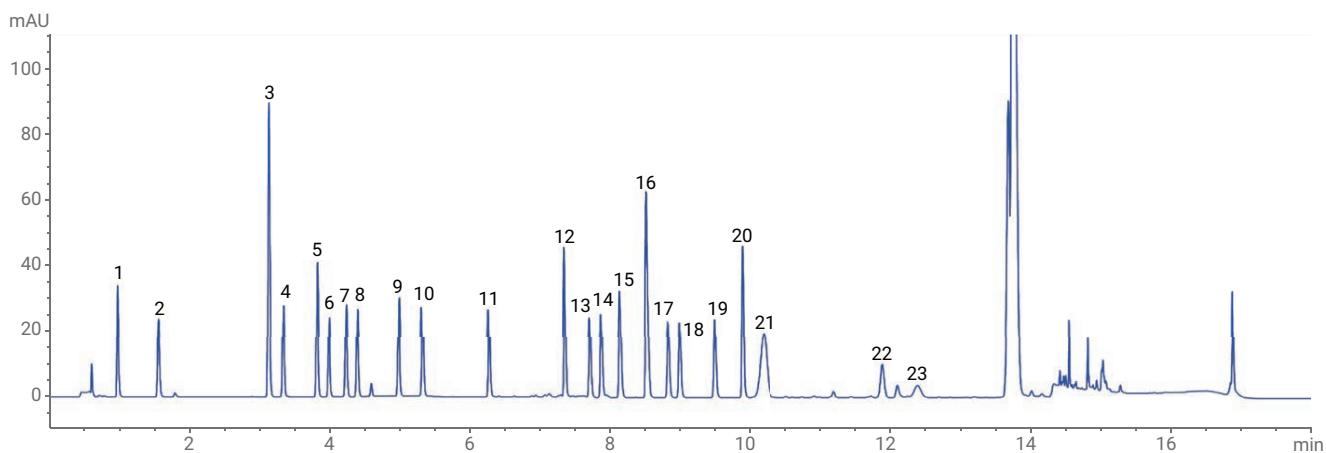


图 1. 23 种氨基酸标准品的分离结果

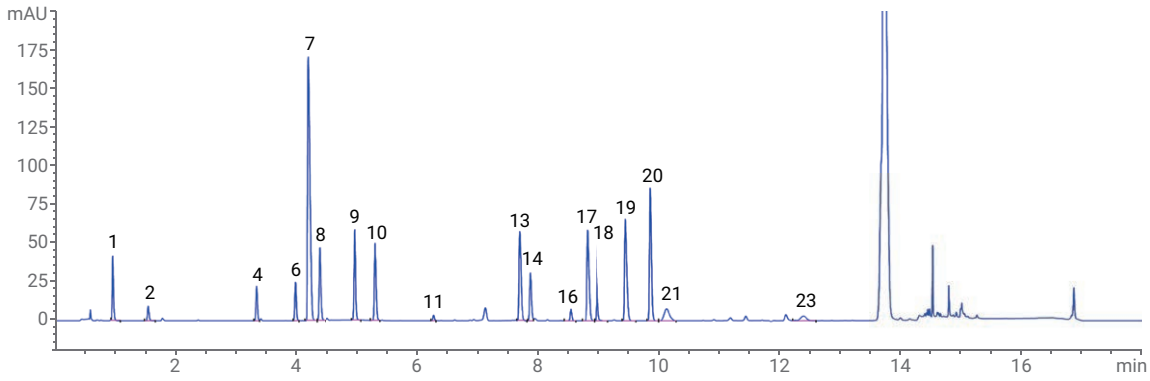


图2. 复方氨基酸注射液的分离结果

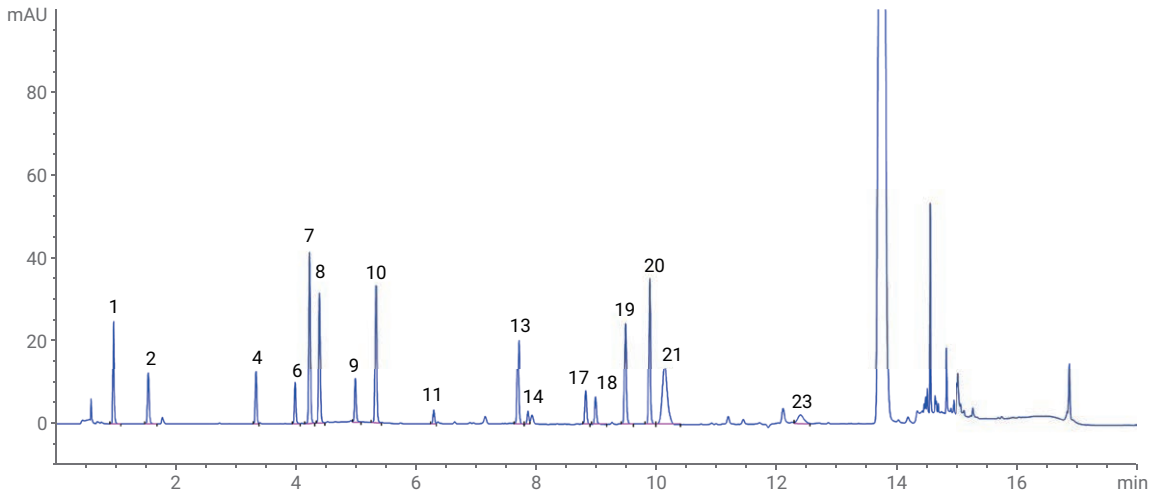


图3. 复方氨基酸片样品的分离结果

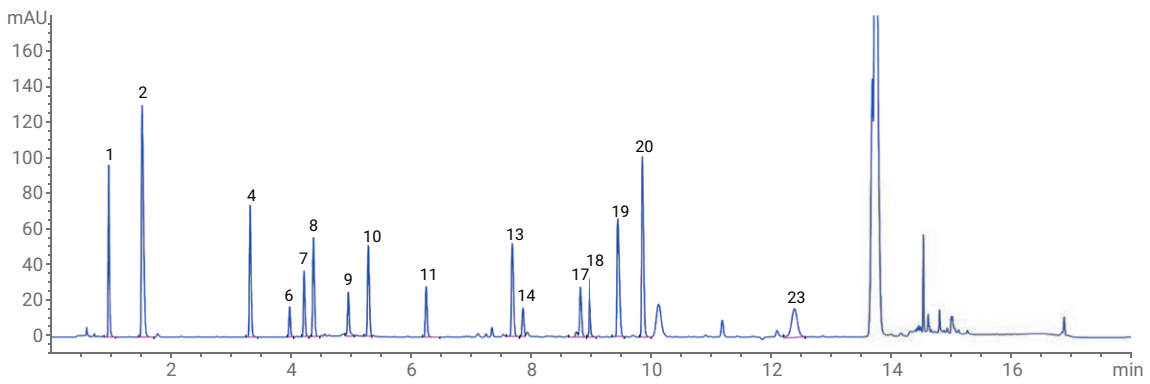


图4. 乳制品（山羊乳）中氨基酸的分离结果

## 结论

本实验使用 Agilent AdvanceBio AAA C18 色谱柱，在原有氨基酸分析方法的基础上，建立了准确、快速、重现性好的氨基酸分析方法，实现了对 23 种氨基酸的定性和定量分析。本实验对三种不同的化学药物和食品基质中的氨基酸进行了分析，均获得了良好的分离度，实现了准确的定量分析。在线衍生为分析过程节省了大量样品前处理时间。因此，该方法非常适合制药、食品及其他行业中大量样品的氨基酸分析。AdvanceBio AAA C18 色谱柱填充表面多孔颗粒填料，能够获得与亚 2  $\mu\text{m}$  填料相当的柱效，柱压仅有亚 2  $\mu\text{m}$  填料的 50% 左右。本实验中的最高梯度压力为 220 bar，完全兼容常规液相色谱系统。此氨基酸分析方法中所用的流动相体系呈碱性，因此硅胶基质色谱柱的耐受能力非常重要。pH 耐受性测试证明，AdvanceBio AAA C18 色谱柱在碱性条件下具有良好的稳定性，可有效保证氨基酸分析获得可靠的重现性<sup>3,4</sup>。在实际样品的分析中，建议使用 AdvanceBio AAA C18 保护柱。

## 参考文献

1. Henderson, J. W. 等人，快速、准确、灵敏、重现性好的 HPLC 氨基酸分析方法。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5980-1193CHCN，**2000**
2. Henderson Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals (采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的改进氨基酸分析方法，适合多种安捷伦液相色谱仪和分离目的)。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5990-4547EN，**2010**
3. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries (使用高 pH 稳定的 Poroshell HPH 键合固定相延长色谱柱在药物分析中的使用寿命)。安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-5022EN，**2014**。仅限研究使用。不可用于诊断目的
4. Long, W. Automated Amino Acid Analysis Using an Agilent Poroshell HPH-C18 Column (使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析)。安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5571EN，**2015**

## 消耗品订购信息

部件号	组件
655950-802	AdvanceBio AAA C18 色谱柱，4.6 × 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$
820750-931	AdvanceBio AAA 保护柱，4.6 × 5 mm
5190-9426	Agilent AdvanceBio AAA 标准品和试剂盒，其中包括：
5061-3339	硼酸盐缓冲液，0.4 M 水溶液，pH 10.2，100 mL
5061-3337	FMOC 试剂，2.5 mg/mL 乙腈溶液，10 × 1 mL
5061-3335	OPA 试剂，10 mg/mL，溶于 0.4 M 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸中，6 × 1 mL 安瓿
5062-2479	二硫代二丙酸 (DTDPA) 试剂，5 g
5061-3330	氨基酸标准品，1 nmol/ $\mu\text{L}$ ，10 × 1 mL
5061-3331	氨基酸标准品，250 pmol，10/包
5061-3332	氨基酸标准品，100 pmol/ $\mu\text{L}$ ，10 × 1 mL
5061-3333	氨基酸标准品，25 pmol/ $\mu\text{L}$ ，10 × 1 mL
5061-3334	氨基酸标准品，10 pmol/ $\mu\text{L}$ ，10 × 1 mL
5062-2478	氨基酸补充剂试剂盒，正缬氨酸、肌氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、色氨酸和 4-羟脯氨酸各 1 g
各个组件可单独订购。	

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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 (中国) 有限公司，2017  
2017 年 9 月 21 日，中国出版  
5991-6572ZHCN

 **Agilent**  
Trusted Answers