

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱对疏水性氨基酸进行手性分析

作者

William J. Long
安捷伦科技有限公司

摘要

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱，以甲醇/甲酸铵缓冲液为流动相，对一系列非衍生化脂肪族氨基酸进行手性分离。使用 ELSD 检测器监测 D 型和 L 型对映体的分离。在所有四种情况下，L 型对映体均首先洗脱。

前言

氨基酸是含有氨基 (-NH_2) 和羧基 (-COOH) 官能团的有机化合物, 此外每种氨基酸分子中还有一条特定侧链 (R 基团)。作为蛋白质基本组成单位的 20 种氨基酸被归类为标准氨基酸。在这 20 种标准氨基酸中, 有 19 种具有手性中心。尽管细菌包膜和一些抗生素中存在少量的 D-氨基酸, 但大多数天然氨基酸为 L 型立体异构体。氨基酸在生物学上具有重要意义, 是重要的营养物质, 通常用于营养补充剂、肥料、饲料和食品技术领域。其工业用途包括生产药物和生物可降解性塑料。

此外, 还可以根据氨基酸侧链的性质对其进行分类。这些性质包括极性 (中性、碱性和酸性) 和疏水性 (芳香族和脂肪族)。疏水性随烃链中 C 原子数目的增加而增强。虽然丙氨酸和甘氨酸可以存在于蛋白质分子内或分子外, 但是大多数脂肪族氨基酸都存在于蛋白质分子内。甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸含有不同的脂肪族取代基, 导致它们的疏水性存在差异。

表面多孔颗粒填料液相色谱柱是液相色谱领域常用的工具。与对应的全多孔颗粒色谱柱相比, 这种色谱柱能够在较低压力下获得较高柱效。这主要是由于该色谱柱的传质距离更短并且填料颗粒的粒径分布明显更窄。更高的柱效能够明显提高分离度和灵敏度, 加快分析速度并改善分析结果。表面多孔颗粒填料已被用于反相和亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离。随着表面多孔颗粒填料技术的成熟, 其也越来越多地运用于化学键合相和其他色谱技术中, 例如手性分离。

许多手性分离通过纤维素基或淀粉基手性选择固定相 (CSP) 以及正己烷等正相溶剂实现。然而, 其他固定相往往采用更常见的溶剂 (例如甲醇) 进行分离, 它们可以更容易地纳入实验室运行的反相方法中。

使用质谱友好的流动相也非常有必要。本应用简报展示了 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T ($2.7\ \mu\text{m}$) 色谱柱的 UHPLC 性能及其对几种非衍生化脂肪族氨基酸的基线分离能力。图 1 列出了这些化合物。

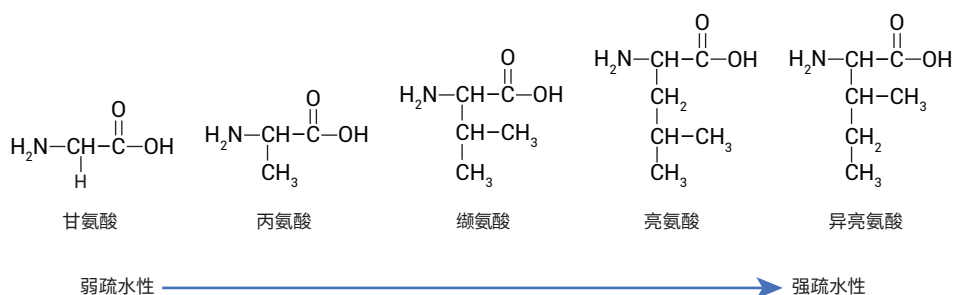


图 1. 脂肪族氨基酸的结构

实验部分

本研究采用低扩散配置的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪。表 1 示出了实验详情。表 2 列出了所用的色谱方法信息。所有化合物均以对映体混合物以及单标的形式进样以完成鉴定。

表 1. 仪器配置

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统	
Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)	
Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)	• 针座组件，超低扩散，用于 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 G4226A（部件号 G4226-87030） • 自动进样器和加热器：毛细管，不锈钢，0.075 × 220 mm（部件号 5067-4784） • 样品瓶，螺口，棕色，带书写签，经认证，2 mL，100/包（部件号 5182-0716） • 瓶盖，螺口，蓝色，PTFE/红色硅橡胶隔垫，100/包（部件号 5182-0717）
Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (MCT) (G7116B)	• 超低扩散加热器（部件号 G7116-60021） • 加热器和色谱柱：InfinityLab Quick Connect 快速连接组件，105 mm，0.075 mm（部件号 5067-5961） • 色谱柱和 ELSD 毛细管，不锈钢，0.075 × 220 mm，SV/SLV（部件号 5067-4784）
Agilent 1290 Infinity II 蒸发光散射检测器 (G7102A)	• 蒸发器温度：30 °C • 雾化器温度：30 °C • 气体流速：1 SLM • 40 Hz
Agilent OpenLab CDS, C.01.07 版	

表 2. 液相色谱方法条件

参数	值
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 685775-603）
流动相	预混合甲醇/甲酸铵 (70/30)，pH 3.0，25 mmol/L
流速	0.21 mL/min
温度（色谱柱）	30 °C
进样量	1 µL
样品浓度	2 mg/mL 水溶液

浓度为 1 mg/mL 的混合溶液。甲酸铵和甲酸同样购自 Sigma Aldrich。甲醇购自 Honeywell (Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)。水经 Milli-Q 系统 (Millipore, Burlington, MA, USA) 0.2 µm 滤膜过滤，分子量为 18 u。

结果与讨论

如图 2A-2D 的色谱图所示，四对脂肪族氨基酸对映体在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱上实现了基线分离。分离均在 4 分钟或更短的时间内完成，所有化合物均实现了基线分离。InfinityLab Poroshell 120 Chiral T 色谱柱采用共价键合到稳定的表面多孔颗粒填料的糖肽固定相。虽然该色谱柱也能在正相溶剂中运行，但大多数实验室的实际应用表明，该色谱柱在各种反相流动相中性质稳定。

替考拉宁是一种两性糖肽，含有可离子化的酸性和碱性官能团。因此，它们可以带正电荷、负电荷或为中性，具体取决于流动相的 pH。这使得在使用这类 CSP 材料进行离子化合物分离时，可以通过离子相互作用进行手性识别。在这类 CSP 的手性识别中发挥了重要的作用。使用抗生素作为 CSP 材料进行手性识别时，其他可能的相互作用包括氢键、空间、偶极-偶极和 π - π 相互作用以及疏水相互作用。这些相互作用可能以不同的组合形式出现，具体由各个分析物的特性和所使用的流动相模式决定。每种分离模式同时提供不同的相互作用以实现手性识别。

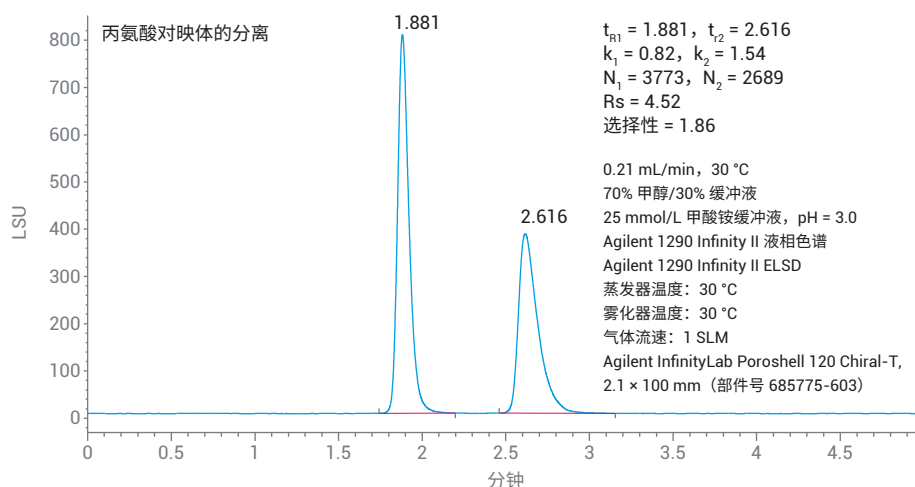


图 2A. 丙氨酸对映体的分离

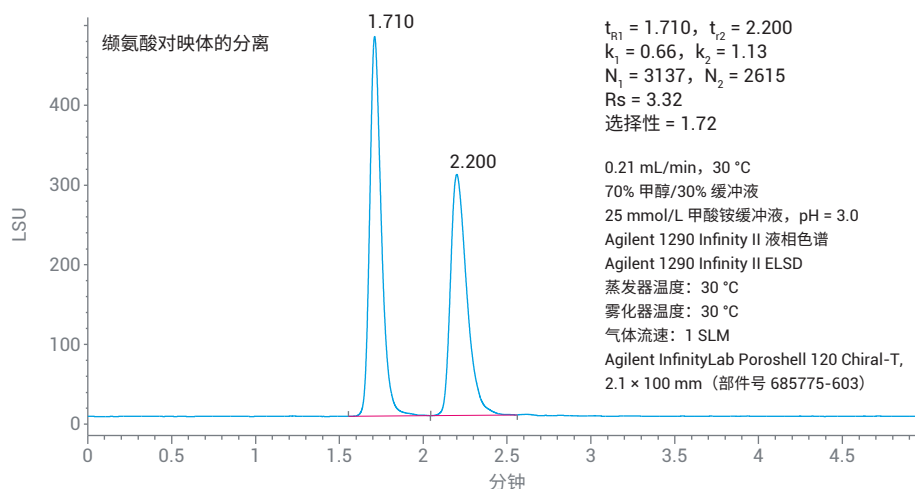


图 2B. 缬氨酸对映体的分离

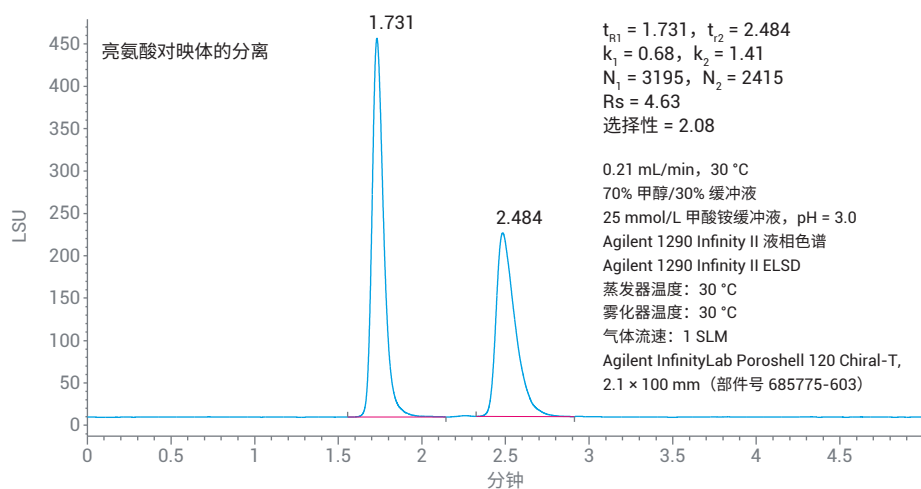


图 2C. 亮氨酸对映体的分离

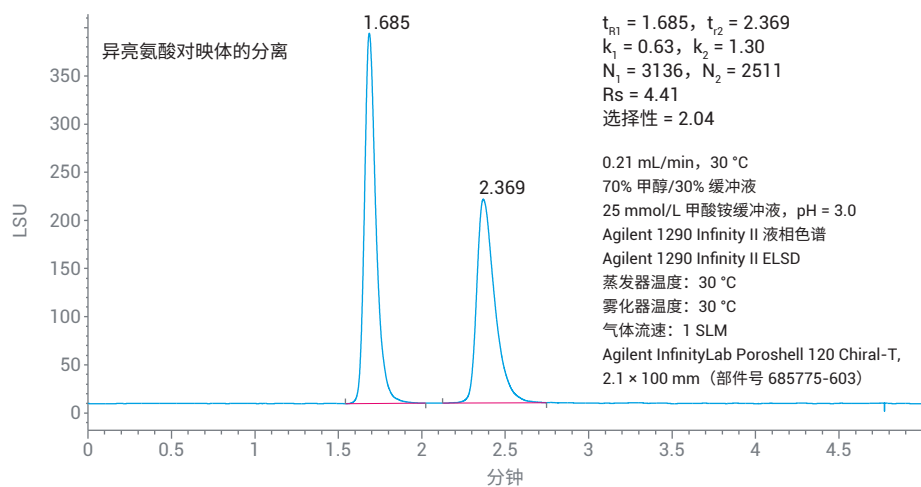


图 2D. 异亮氨酸对映体的分离

表 3. 手性脂肪族氨基酸分离的色谱数据汇总

化合物	k_1	k_2	R_s	选择性
丙氨酸	0.82	1.54	4.52	1.86
缬氨酸	0.66	1.13	3.32	1.72
亮氨酸	0.68	1.41	4.63	2.07
异亮氨酸	0.63	1.30	4.41	2.04

结论

Agilent InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱提供了一种稳定的脂肪族氨基酸对映体分离方法。这款色谱柱为研究中的所有化合物提供了良好的分离度和峰形。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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，2019
2019 年 9 月 12 日，中国出版
5994-1366ZHCN