

氨基酸的反相液相色谱内标法分析

LC-058

摘要： 本文使用岛津LC-2010液相色谱仪建立了同时检测17种氨基酸的分析方法。以正亮氨酸为内标物，异硫氰酸苯酯为柱前衍生剂，使用C₁₈柱，乙腈/水和pH为6.5的醋酸钠为流动相，紫外检测器于254 nm对17种氨基酸进行同时检测。各氨基酸标准曲线线性相关系数在0.99884至0.99999之间。经多次衍生得出的定量结果的RSD%在0.087%至3.072 %之间。结果令人满意。

关键词： 反相液相色谱 内标法 检测 氨基酸

氨基酸是生物体中的重要生命物质，是组成酶和蛋白质的基本单元。氨基酸对生物大分子的活性及其生理功能起着极为重要的作用。各种氨基酸在生物体中具有不同的生物功能，因此，准确灵敏的测定食物、药品和生物样品中的氨基酸含量具有十分重要的意义。

柱前衍生化液相色谱法分析氨基酸具有分析时间短、灵敏度高的优点。常用的衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、萘-2,3-二甲醛(NDA)、9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)和异硫氰酸苯酯(PITC)等。其中PITC衍生剂可同时测定伯氨酸和仲氨酸，衍生副产物无干扰，衍生物十分稳定，因此应用广泛。以正亮氨酸为内标物，采用内标法为定量方法可以减小外标法在样品前处理及进样过程中所造成的误差，使得结果更为真实可信。

本文使用岛津液相色谱仪LC-2010，针对17种氨基酸，建立了反相液相色谱内标法的测定方法。

实验部分

1.1 试剂与仪器

电池除去外包装和密封材料后，放入烧杯中，分别加入水、硝酸和盐酸，加热微沸，冷却后过滤，稀释定容至刻度，待测。

1.2 分析条件

试剂：乙腈、超纯水，HPLC级；醋酸钠、冰乙酸，分析纯；氨基酸及正亮氨酸标准品。

仪器：LC-2010

1.2 色谱条件

色谱柱：Shim-pack VP-ODS(4.6 mm I.D.×150 mm L., 5 μm)；流动相：A：pH6.5的醋酸钠缓冲液(7.6 g醋酸钠，加750 mL水溶解，用冰乙酸调节pH至6.5，加水至900 mL)B：乙腈/水=4/1(v/v)；流速：1.0 mL/min；洗脱方式：梯度洗脱(梯度见表1)；柱温：43℃；检测波长：254 nm；进样量：4 μL，内标法定量(正亮氨酸为内标物)

表1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
0	Pumps	Pump B Conc.	0
8	Pumps	Pump B Conc.	15
17	Pumps	Pump B Conc.	34
21	Pumps	Pump B Conc.	60
23	Pumps	Pump B Conc.	100
26	Pumps	Pump B Conc.	100
26.01	Pumps	Pump B Conc.	0
33	Controller	Stop	

1.3 氨基酸标准溶液系列的配制

0.1 mol/mL的盐酸稀释氨基酸混标至0.05 μmol/mL、0.1 μmol/mL、0.25 μmol/mL、0.5 μmol/mL、1.0 μmol/mL，0.1 mol/mL的盐酸稀释正亮氨酸至100 μmol/mL。

1.4 氨基酸衍生方法

■ 结果与讨论

2.1 各氨基酸的校准曲线

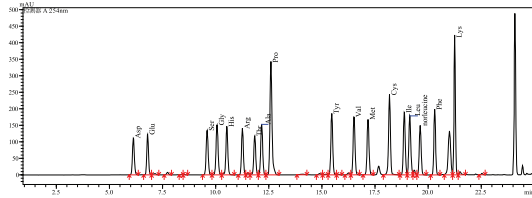


图1-1 氨基酸衍生液色谱图

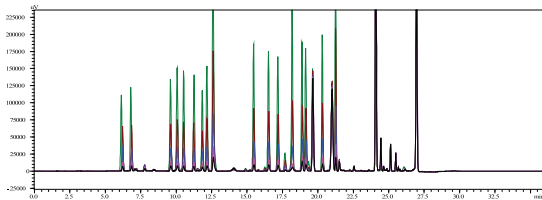


图1-2 五个不同浓度下的氨基酸衍生液的色谱图

图1-1是浓度为1.0 μmol/L的氨基酸衍生后的色谱图，图1-2是17种氨基酸在五个不同浓度下衍生采集得到的色谱图，各组分均可得到良好的分离。

各氨基酸的校准曲线及方程见图2-1至图2-17。各组分的标准曲线线性关系良好，除Asp的R值为0.99884外，其余氨基酸的R值均在0.999以上。

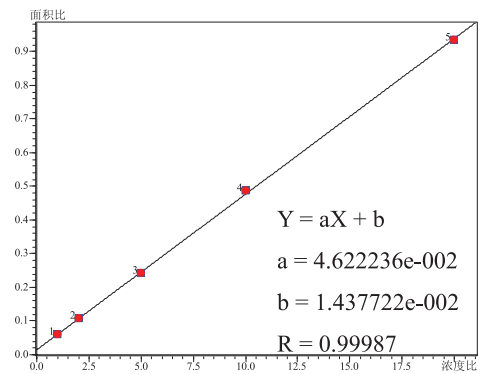


图 2-3 Ser 的标准曲线

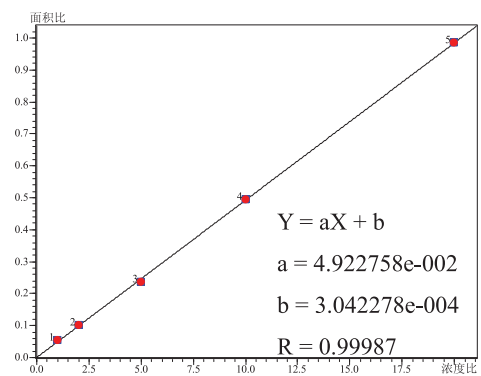


图 2-5 His 的标准曲线

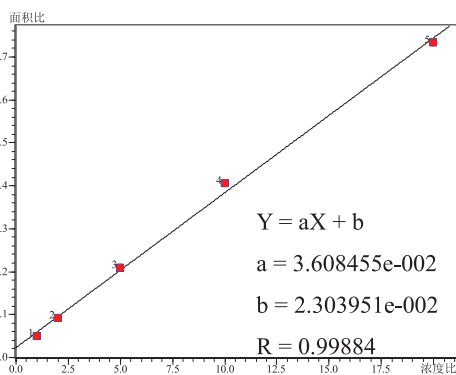


图 2-1 Asp 的标准曲线

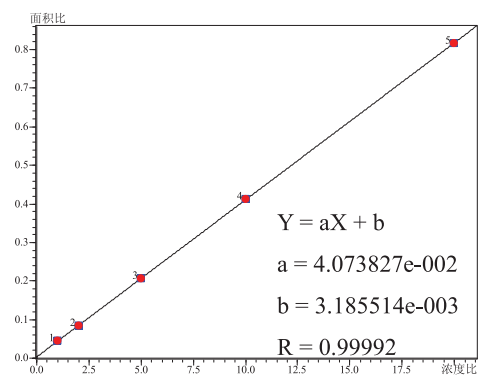


图 2-7 Thr 的标准曲线

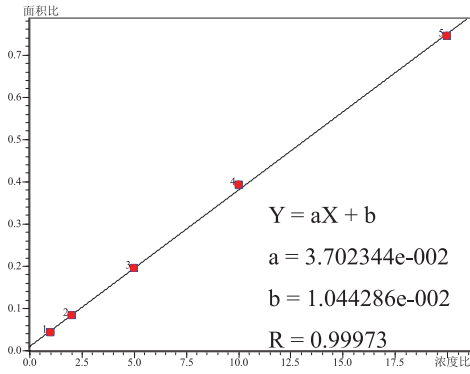


图 2-2 Glu 的标准曲线

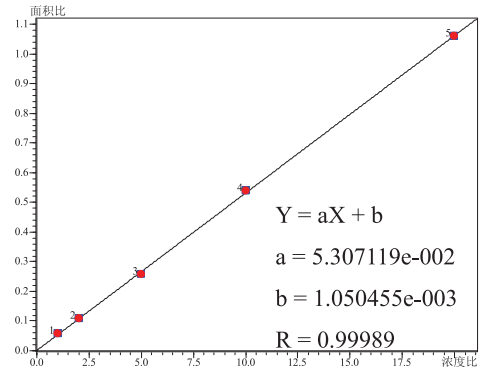


图 2-8 Ala 的标准曲线

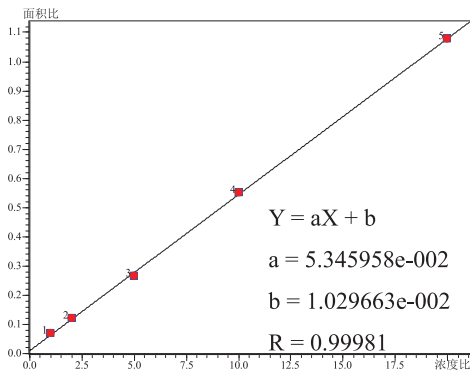


图 2-4 Gly 的标准曲线

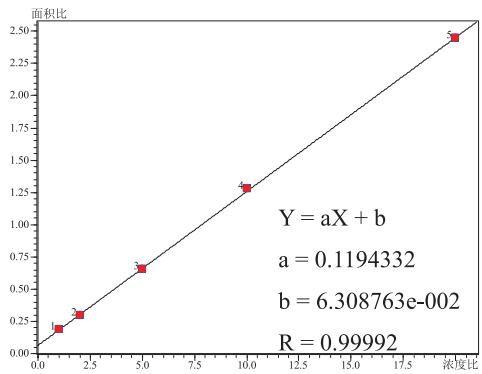


图 2-9 Pro 的标准曲线

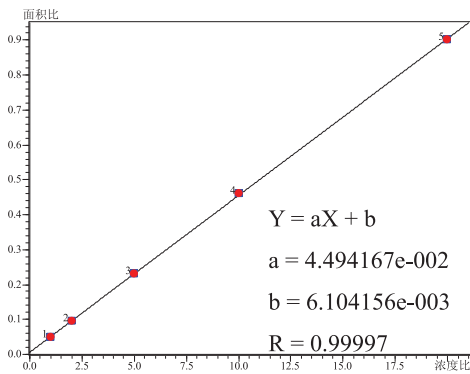


图 2-6 Arg 的标准曲线

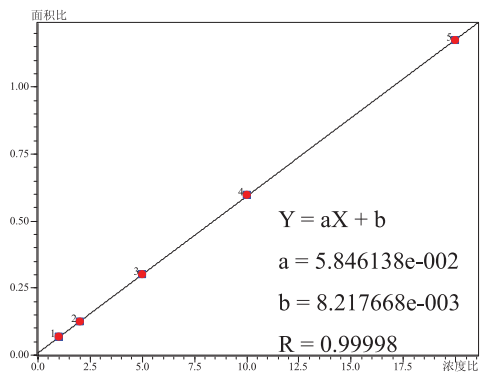


图 2-11 Val 的标准曲线

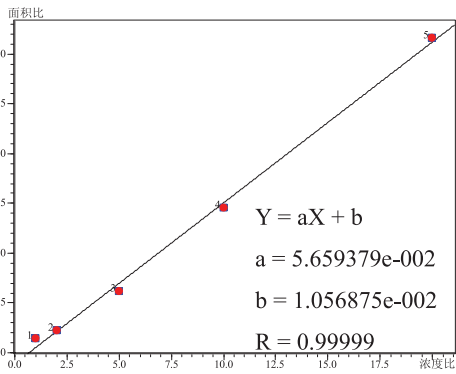


图 2-13 Cys 的标准曲线

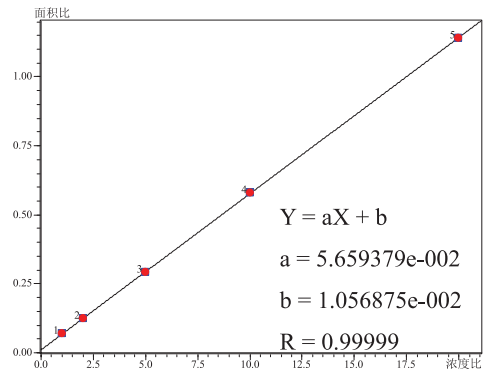


图 2-12 Met 的标准曲线

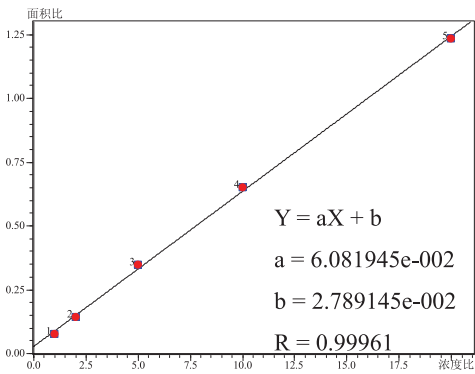


图 2-15 Leu 的标准曲线

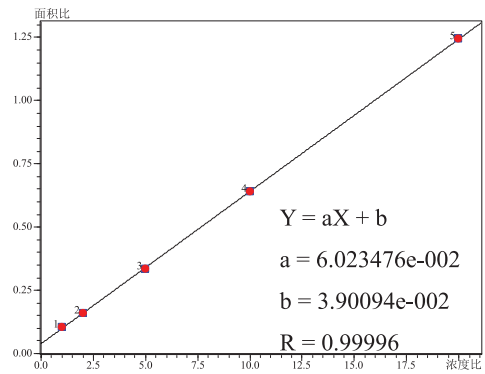


图 2-14 Ile 的标准曲线

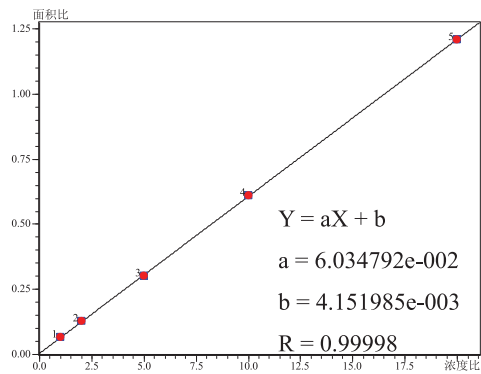


图 2-10 Tyr 的标准曲线

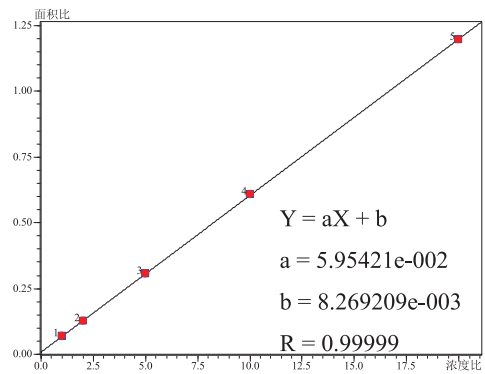


图 2-16 Phe 的标准曲线

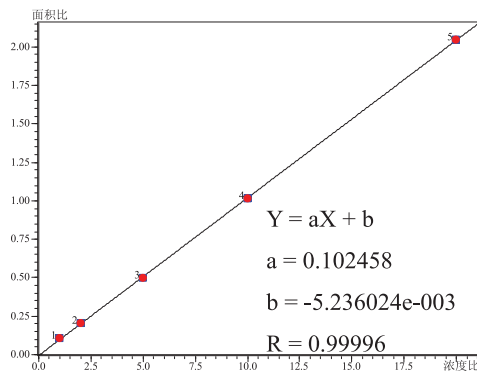


图 2-17 Lys 的标准曲线

2.2 方法的精密度及稳定性实验

对同一份浓度为 $0.25 \mu\text{mol/mL}$ 的氨基酸衍生液重复进样3次，得到的色谱图见图3-1，对浓度为 $0.25 \mu\text{mol/mL}$ 的氨基酸分3次衍生，得到的色谱图见图3-2。两种实验条件下得到的方法的重现性结果(RSD%表示)见表2。同一样品3次重复进样实验的RSD%在0.011%-3.152%之间。三次分别衍生实验的RSD%在0.087%-3.087%之间，结果的重现性良好。说明内标法的使用，可有效减少衍生过程及进样量对结果所造成的误差。

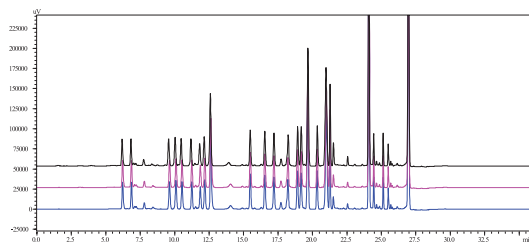


图 3-1 同一衍生液 3 次重复进样的色谱图

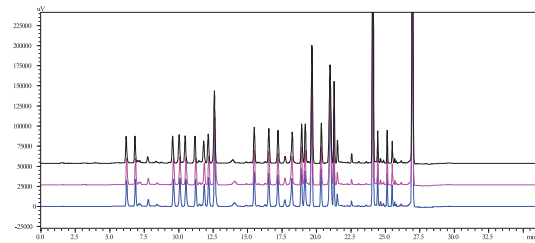


图 3-2 3 次分别衍生样品的色谱图

表 2 方法的重现性结果

氨基酸	3 次进样 RSD %	3 次衍生 RSD %
Asp	3.152	3.072
Glu	2.992	2.639
Ser	2.614	2.062
Gly	2.598	1.966
His	2.744	2.301
Arg	0.198	0.479
Thr	0.848	1.474
Ala	2.423	1.667
Pro	0.521	0.087
Tyr	0.242	0.392
Val	0.222	0.589
Met	0.011	0.750
Cys	0.274	2.141
Ile	0.280	1.083
Leu	1.118	0.517
Phe	0.209	0.986
Lys	0.238	0.906

结论

17种氨基酸先用异硫氰酸苯酯衍生，再用岛津 LC-2010液相色谱仪检测，以正亮氨酸为内标物，内标法定量。该方法不仅有较好的灵敏度，而且有很好的重现性，适于在常规检测使用。