

Application News

No. L458

高效液相色谱
High Performance Liquid Chromatography

快速高分离分析的应用 (第 47) 采用自动进样器 SIL-30AC 进行 氨基酸自动柱前衍生分析 (第 3)

High Speed with High Resolution Analysis (Part 47)
Analysis of Pre-Column Derivatized Amino Acids by the Nexera SIL-30AC Autosampler (part3)

通常，通过氨基酸组成分析对蛋白质多肽的结构进行推定。
在近几年，将支链氨基酸 (Branched Chain Amino Acid: BCAA) 等
用作功能性成分，以对其定量来分析氨基酸。

在应用报告 No. L432、No. L437 中为您介绍通过自动进样器
“SIL-30AC”的预处理功能，使用邻苯二甲醛 (OPA) 对氨基酸进行
荧光衍生化的示例。

本文将为您介绍短时间内分析蛋白质组分氨基酸的示例。

■ 同时分析 17 种氨基酸

Simultaneous Determination of 17 Amino Acids

本方法中灵活运用 Nexera 自动进样器 “SIL-30AC” 的自动预
处理功能，在进样器中自动进行氨基酸的 OPA 衍生化。表 1 为本
方法使用的衍生化试剂。通过表 2 所示的分析条件得到的 17 种氨
基酸混合标准溶液的色谱图如图 1 所示。如果使用应用报告 No.
L437 中为您介绍的重叠进样功能，则在分析过程中可进行下一样
品的衍生化处理与进样准备，从而可以缩短总分析时间。

表 1 衍生化试剂
Derivatization Reagents

- Mercaptopropionic Acid
3-Mercaptopropionic Acid 10 μ L in 0.1 mol/L Borate Buffer (pH9.2) 10 mL
- o - phthalaldehyde - Ethanol Solution
o - Phthalaldehyde 10 mg in 0.1 mol/L Borate Buffer (pH9.2) 5 mL
- Fluorenyl Methyl Chloro Formate - Acetonitrile Solution
9-Fluorenyl Methyl Chloro Formate 4 mg in Acetonitrile 20 mL

表 2 分析条件
Analytical Conditions

Column	: YMC-Triart C18 1.9 μ m (50 mm L. \times 3.0 mm I.D., 1.9 μ m, YMC CO., LTD.)
Mobile Phase	: A: 20 mmol/L Phosphate Potassium Buffer (pH 6.2) B: 60/40 Acetonitrile/Methanol
Time Program	: Gradient Elution
Flowrate	: 1.2 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 1 μ L
Detection	: RF-20A _{xs} Ex. at 350 nm, Em. at 450 nm → Ex. at 266 nm, Em. at 305 nm (8.5 min)
Cell Temp.	: 30 °C
Flow Cell	: Conventional Cell

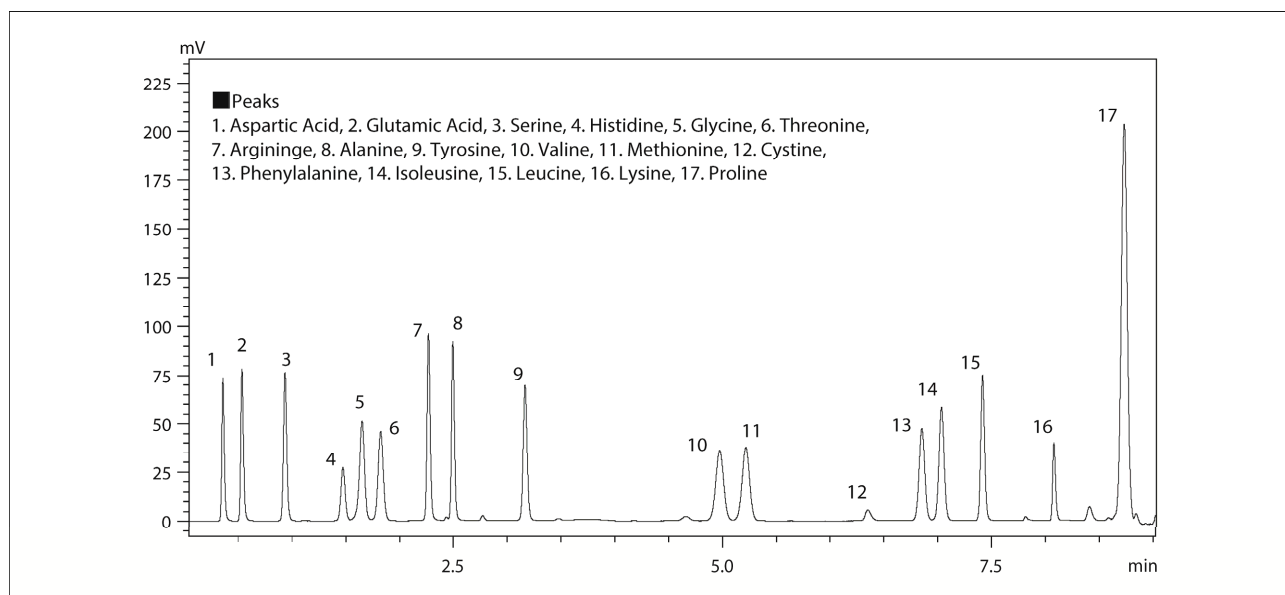


图 1 17 种氨基酸混合标准溶液 (各 25 μ mol/L) 的色谱图
Chromatogram of 17 Amino Acids Standard Solution (25 μ mol/L each)

■ 血管紧张素 I 水解产物的分析

Analysis of Angiotensin I Hydrolysate

血管紧张素是具有升压作用的多肽。存在 I ~ IV 4 种血管紧张素，构成的氨基酸的数量与种类不同。血管紧张素 I 由天门冬氨酸、精氨酸、缬氨酸、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和 2 分子组氨酸共 10 个氨基酸残基构成，在血管紧张素转化酶的作用下，将其转换为升压作用最高的血管紧张素 II。

在 0.5 mg 血管紧张素 I 中添加 500 μ L 的 6 mol/L 盐酸（ICP 用），并在 110 $^{\circ}$ C 以减压密封状态放置 22 个小时再进行水解。

此后，用氮气吹干。

用 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 10 mL，进行再溶解。样品分析的结果如图 2 所示。

以 2 分子组氨酸，1 分子其他氨基酸的比率检测，结果与实际的氨基酸序列一致。

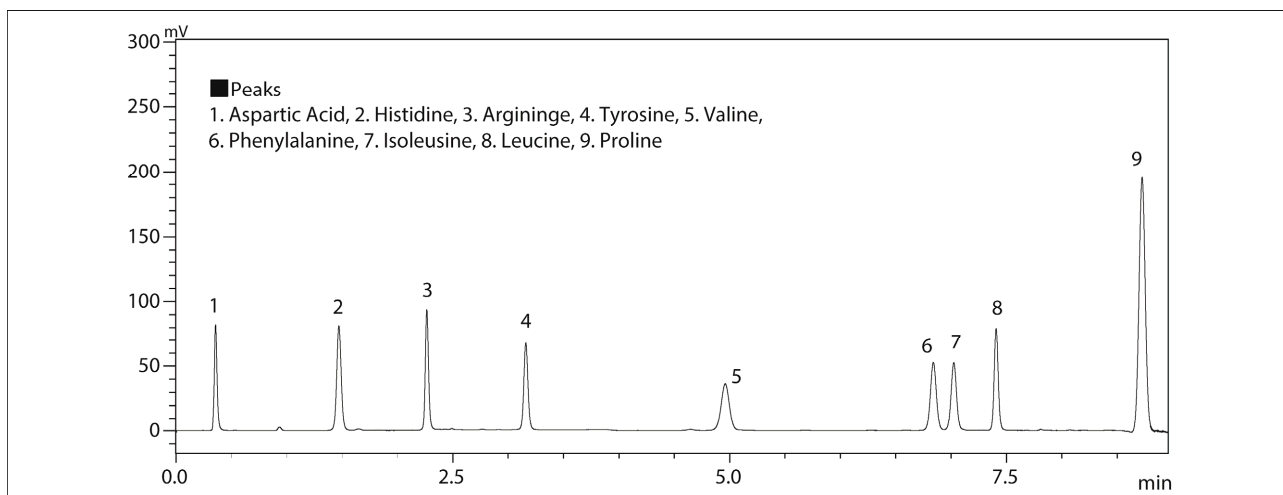


图 2 血管紧张素 I 水解产物的色谱图
Chromatogram of Angiotensin I Hydrolysate

■ 牛血清白蛋白水解产物的分析

Analysis of Bovine Serum Albumin Hydrolysate

牛血清白蛋白是在众多生化实验中使用的蛋白质。

在 3.5 mg 的牛血清白蛋白中添加 500 μ L 的 6 mol/L 盐酸（ICP 用），并在 110 $^{\circ}$ C 以减压密封状态放置 22 个小时再进行水解。

此后，用氮气吹干。

用 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 10 mL，进行再溶解。样品分析的结果如图 3 所示。

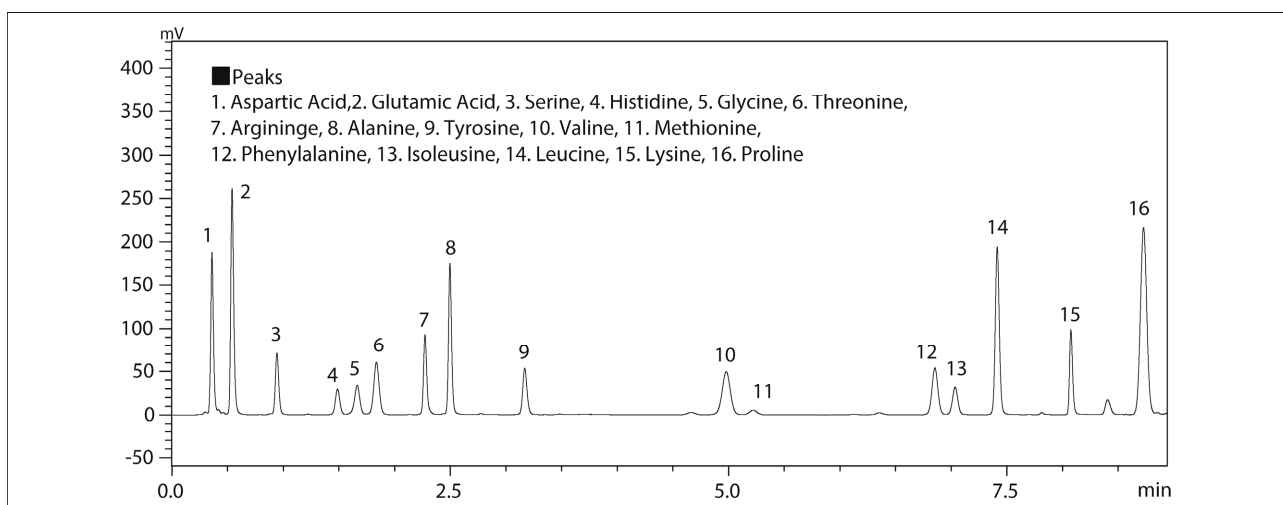


图 3 牛血清白蛋白水解产物的色谱图
Chromatogram of Bovine Serum Albumin Hydrolysate



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2014 年 6 月