

# Application News

## No. L529A

高效液相色谱法

### 使用一体型 LC 系统 Prominence™-i 的自动预处理功能同时分析氨基酸

在食品、制药等各种领域都需要进行氨基酸分析。在使用 HPLC 的氨基酸分析，常用的方法是柱后衍生法。本公司的氨基酸分析系统也采用了柱后衍生法。但是，基于所使用的色谱柱的特性，柱后衍生法存在很难实现快速分析的问题。

关于使用 UHPLC 系统，通过柱前衍生法快速进行氨基酸分析的情况，已经在 L432A 进行了介绍。在这里为您介绍使用更加简便、并且是一体型的 HPLC 系统，通过自动柱前衍生法进行氨基酸分析。

Y. Osaka

#### ■ 自动柱前衍生化

Prominence-i (LC-2030C) 标配了自动进样器的自动预处理功能，如果使用“同时注入”功能，则可以从多个试剂瓶中依次吸引溶液，在针内进行混合。人们熟知的氨基酸衍生化反应试剂有邻苯二甲醛 (OPA)、9- 芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 等，这些试剂在室温下会与氨基酸进行快速反应。通过使用本功能，可以自动在针内进行反应。图 1 所示为设置内容，图 2 所示为自动柱前衍生化流程。如上所述，这种对试剂进行依次吸取的动作也可以轻松进行设置。

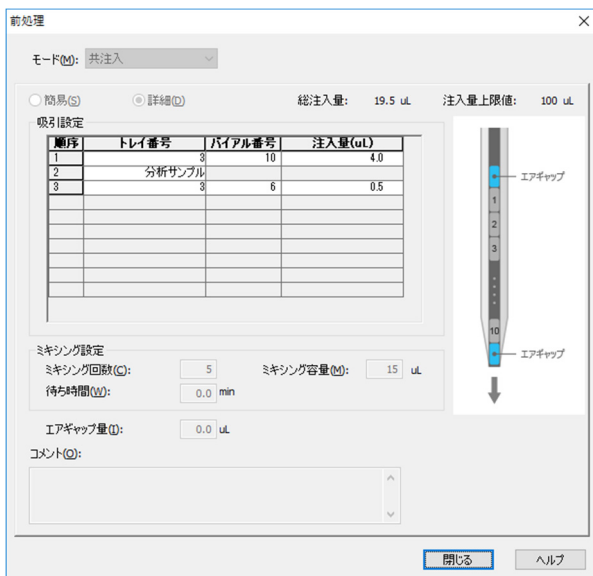


图 1 Prominence-i (LC-2030C) 的预处理 (同时注入) 设定画面

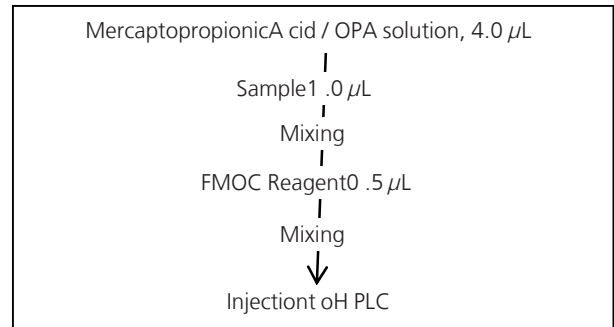


图 2 使用 Prominence-i 进行自动柱前衍生化的流程

表 1 衍生物化学试剂

- Mercaptopropionic Acid Reagent  
Add 10 μL of 3- mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent  
Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of *o*- phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.
- Mercaptopropionic Acid / OPA solution  
Mix equal volume of Mercaptopropionic Acid Reagent and OPA Reagent.
- FMOC Reagent  
Dissolve 10 mg of 9- fluorenylmethyl chloroformate into 50 mL of acetonitrile.

#### ■ 分析结果

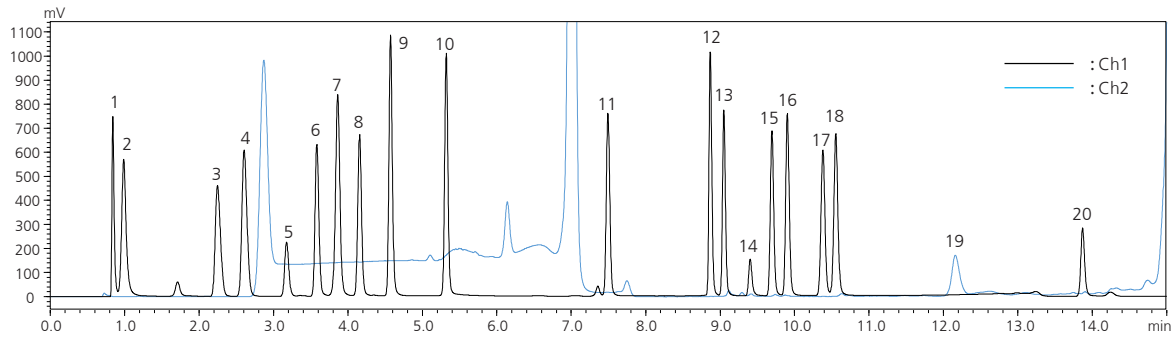
表 2 及表 3 所示为分析条件。图 3 所示为对 20 种蛋白质构成氨基酸成分进行分析的色谱图。

表 2 分析条件

Column	: Shim-pack™ XR-ODSII 100 mm.L. × 3.0 mm.I.D., 2.2 μm
Mode	: Low pressure gradient
Mobile phase	: A) 20 mmol/L Sodium acetate buffer (pH6) B) Water/Acetonitrile = 100/900 C) 20 mmol/mL Sodium acetate buffer (pH5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na
Flow rate	: 1.0 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1 μL
Detection	: Fluorescence detector Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

表 3 梯度时间程序

Time (min)	A.conc	B.conc	C.conc
0	95	5	0
0.2	93	7	0
1	93	7	0
4	87	13	0
5	0	15	85
7.5	0	30	70
12	0	35	65
14	0	45	55
14.01	0	95	5
17	0	95	5



1, Aspartic Acid 2, Glutamic Acid 3, Asparagine 4, Serine 5, Glutamine 6, Histidine 7, Glycine 8, Threonine 9, Arginine 10, Alanine 11, Tyrosine 12, Methionine 13, Valine 14, Cystine 15, Tryptophan 16, Phenylalanine 17, Isoleucine 18, Leucine 19, Proline 20, Lysine

图 3 20 种蛋白质构成氨基酸成分的同时分析 (各 12.5 pmol/μL)

## 线性与重复性

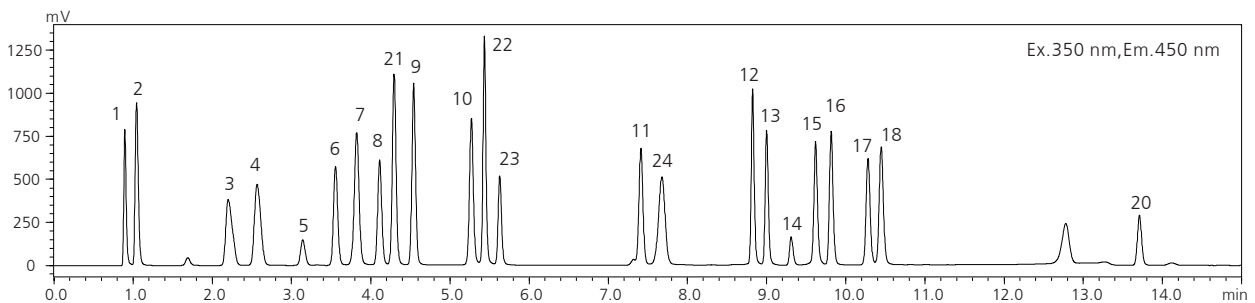
针对各成分的氨基酸, 对 0.25、1.25、2.5、12.5、25 (Pro 为 2.5、12.5、25、62.5、125) (pmol/μL) 浓度范围内的线性 ( $r^2$ 、线性相关系数) 和 12.5 pmol/μL 下的重复分析 ( $n = 6$ ) 的面积重现性进行了评价。上述结果如表 4 所示。

表 4 线性和面积重复性

	Linearity ( $r^2$ )	Area (%RSD)		Linearity ( $r^2$ )	Area (%RSD)
Asp	0.999096	1.343	Tyr	0.999793	0.985
Glu	0.999303	1.069	Met	0.999956	0.929
Asn	0.999717	0.656	Val	0.999687	0.850
Ser	0.999927	0.962	Cystine	0.999709	1.586
Gln	0.999955	0.990	Trp	0.999899	0.676
His	0.999927	0.680	Phe	0.999832	0.787
Gly	0.999941	0.871	Ile	0.999754	0.786
Thr	0.999630	0.949	Leu	0.999904	2.379
Arg	0.999977	0.981	Pro	0.997545	10.643
Ala	0.999880	1.899	Lys	0.999794	0.720

## 其他氨基酸的分析例

在氨基酸中除了有 20 种蛋白质构成氨基酸成分之外, 还有各种对健康有益的氨基酸。在这里为您介绍加入了近年来倍受人们关注的瓜氨酸、牛磺酸、茶氨酸、γ-氨基丁酸 (GABA) 的分析实例 (图 4)。



21, Citrulline 22, Taurine 23, Theanine 24, GABA  
※ 如果包含 GABA, 则有可能会影响到 Tryptophan 的定量精度。

图 4 包含功能性成分的 23 种氨基酸成分的分析例 (各 12.5 pmol/μL)

Prominence 及 Shim-pack 是岛津制作所株式会社的商标。



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: 2018 年 10 月

## 实际试样分析

图 5 所示为啤酒的分析例。用纯水对试样进行 100 倍稀释, 使用 0.22 μm 滤膜过滤后, 进行分析。其中, 分析条件如表 2 及表 3 所示。

如上所述, 通过使用 Prominence-i 的自动预处理功能, 可以简单地进行分析柱前衍生化分析。衍生反应在针内进行, 因此, 可以将试剂和试样控制到最低限度, 并将反应物全部导入色谱柱, 可以进行高灵敏度的分析。同本公司过去在样品瓶内进行衍生反应的方法相比, 不再需要准备在反应时使用的空样品瓶, 因此, 可以节省分析准备时间。

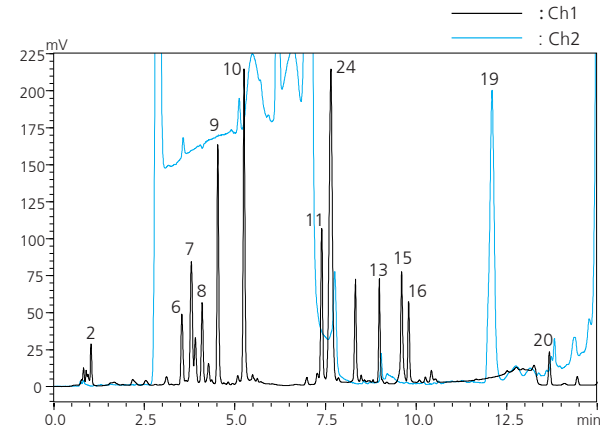


图 5 啤酒分析的色谱  
(谱峰编号参见图 3 及图 4)