

## 使用自动预处理柱前衍生化功能快速同时分析多种氨基酸

01-00007-CN

大城 真爱

### 对用户的好处

- ◆ 可以在一个周期 24 分钟内完成 20 种蛋白质构成氨基酸成分的分析。
- ◆ 通过使用 Nexera XR 配置的自动预处理功能，可以简便地进行柱前衍生化氨基酸分析。
- ◆ Nexera XR 还可以完成氨基酸之外的分析，提高装置的工作效率。

### 前言

在食品、制药开发等各种领域都需要分析氨基酸。使用 HPLC 分析氨基酸，常用的方法是柱后衍生化法。本公司的氨基酸分析系统也采用了柱后衍生化法。但是，基于所使用的色谱柱的特性，柱后衍生化法存在很难实现快速分析的问题。另一方面，分析预衍生氨基酸的柱前衍生化法通过自动化衍生，比柱后衍生化法可以更快、更简便地完成分析。

本文中为您介绍通过使用高效液相色谱仪 Nexera XR 的自动柱前衍生化法优化氨基酸分析条件的案例。

### 自动柱前衍生化

Nexera XR 标配自动预处理功能。除标准的进样动作之外，还可以实现通过自动进样器稀释样品、添加试剂等各种动作。众所周知，衍生化试剂主要有邻苯二甲醛 (OPA) 和 9- 芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 等，上述试剂在添加样品后，在室温下与氨基酸迅速发生反应。因此，使用自动预处理功能可自动完成柱前衍生化处理，减少预处理所需的时间。

此外，在本文所述的方法中，衍生化反应在自动进样器的进样针内进行，因此，和过去一样，无需另行安装反应用的试剂瓶，最大限度地减少试剂的消耗量。

图 1 所示为柱前衍生化氨基酸的衍生化反应简图，图 2 所示为使用本系统分析 20 种蛋白质构成氨基酸成分的色谱图。

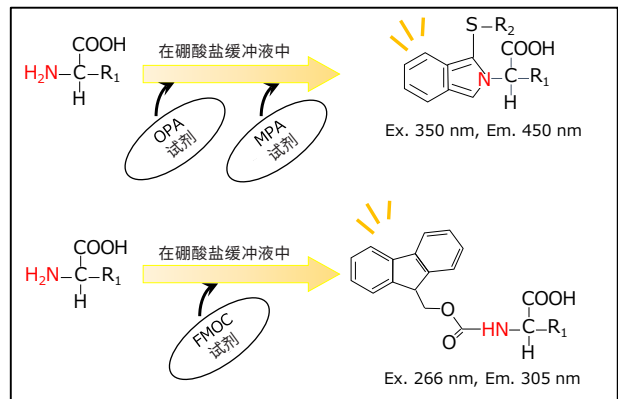
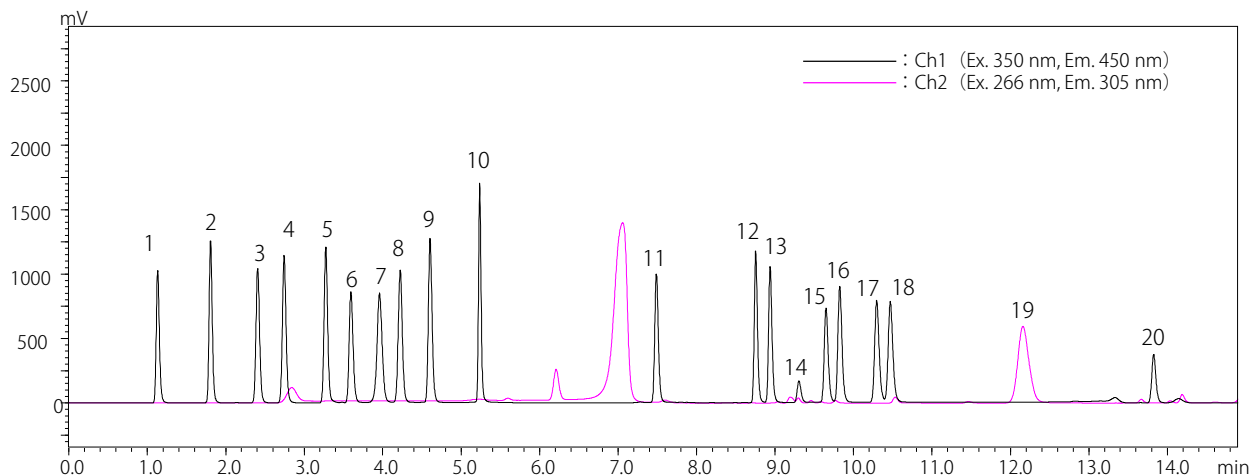


图 1 柱前衍生化氨基酸的衍生化反应

上：使用 OPA 试剂的反应

下：使用 FMOC 试剂的反应（本文中用于脯氨酸的衍生化）



1. 天门冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 天冬酰胺 4. 丝氨酸 5. 谷氨酰胺 6. 组氨酸 7. 甘氨酸 8. 苏氨酸 9. 精氨酸 10. 丙氨酸 11. 酪氨酸 12. 蛋氨酸 13. 缬氨酸 14. 胱氨酸 15. 色氨酸 16. 苯丙氨酸 17. 异亮氨酸 18. 亮氨酸 19. 脯氨酸 20. 赖氨酸

图 2 同时分析 20 种蛋白质构成氨基酸成分 (各 25 μmol/L)

## 分析条件

表 1 所示为分析条件，表 2 所示为梯度时间程序。

表 1-1 分析条件

|       |   |
|-------|---|
| 色谱柱   | : Shim-pack™ XR-ODSII <sup>1</sup><br>100 mm×3.0 mm I.D., 2.2 μm  |
| 模式    | : 低压梯度  |
| 流动相   | : A) 20 mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 6)<br>B) 水 / 乙腈 =100:900<br>C) 20 mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 5), 含有<br>0.5 mmol/L EDTA-2Na |
| 流速    | : 1.0 mL/min  |
| 柱温    | : 35°C  |
| 进样量   | : 1 μL  |
| 样品冷却器 | : 4°C   |
| 检测器   | : 荧光检测器 (池温度 35°C)<br>Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm<br>Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm                                    |

\*1: P/N 228-41624-92

表 1-2 分析条件 (流动相配制方法)

- 流动相 A  
将 2.67 g 三水合乙酸钠和 41 μL 醋酸加入 1000 mL 纯水中。
- 流动相 C  
将 0.19 g EDTA-2Na、2.03 g 三水合乙酸钠和 308 μL 醋酸加入 1000 mL 纯水中。

表 2 梯度时间程序

| 时间 (分钟) | A 浓度 | B 浓度 | C 浓度 |
|---------|------|------|------|
| 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    |
| 16.99   | 0    | 95   | 5    |
| 17      | 5    | 95   | 0    |
| 18      | 5    | 95   | 0    |

## 标准曲线范围

各氨基酸成分在 1, 5, 12.5, 25, 100 (μmol/L) 的浓度范围内的线性 ( $r^2$ , 相关系数) 均为 0.999 以上, 结果良好。另外, 在 25 μmol/L 下重复分析 (n=10), 对面积再现性进行了评价。其结果如表 3 所示。

表 3 面积再现性

|       | 面积 (%RSD) |      | 面积 (%RSD) |
|-------|-----------|------|-----------|
| 天门冬氨酸 | 1.66      | 酪氨酸  | 1.86      |
| 谷氨酸   | 1.66      | 蛋氨酸  | 1.68      |
| 天冬酰胺  | 1.70      | 缬氨酸  | 1.61      |
| 丝氨酸   | 1.79      | 胱氨酸  | 1.64      |
| 谷氨酰胺  | 1.76      | 色氨酸  | 1.69      |
| 组氨酸   | 1.50      | 苯丙氨酸 | 1.63      |
| 甘氨酸   | 1.77      | 异亮氨酸 | 1.61      |
| 苏氨酸   | 1.67      | 亮氨酸  | 1.66      |
| 精氨酸   | 1.49      | 脯氨酸  | 5.12      |
| 丙氨酸   | 1.75      | 赖氨酸  | 1.89      |

## 实际样品的分析

图 3 所示为啤酒的分析例。样品使用纯水稀释至 10 倍或 100 倍, 使用 0.22 μm 的过滤器过滤后用于分析。其中, 分析条件如表 1 及表 2 所示。

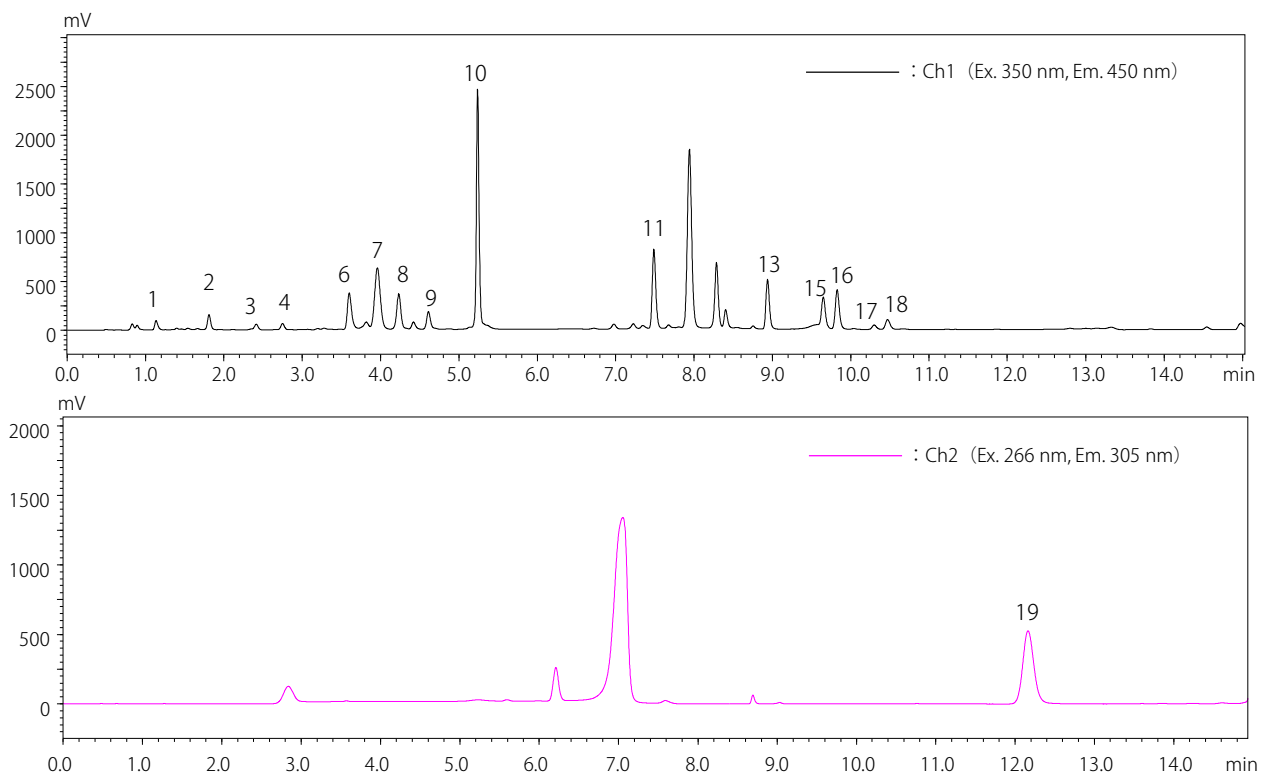


图 3 啤酒的色谱图

(上段: 10 倍稀释样品在 Ch1 的测定结果、下段: 100 倍稀释样品在 Ch2 的测定结果 峰号参见图 2)

## 自动柱前衍生化的设置

本分析中使用的衍生化试剂的制备方法如表 4 所示。另外，制备后的各衍生化试剂在自动进样器内的设置位置示例如图 4 所示。

表 4 衍生化试剂配制方法

- 巯基丙酸试剂 (MPA 试剂)  
将 10 μL 3-巯基丙酸加入 10 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液中。
- OPA 试剂  
将 0.3 mL 乙醇加入 10 mg 邻苯二甲醛中并完全溶解。然后加入 0.7 mL 0.1 mol/L 硼酸
- MPA/OPA 溶液  
混合 600 μL 的 MPA 试剂和 300 μL 的 OPA 试剂。
- FMOC 试剂  
将 10 mg 9-芴基甲基氯甲酸酯溶解到 100 mL 乙腈中。
- 磷酸水溶液  
将 0.5 mL 磷酸加至 100 mL 纯水中。

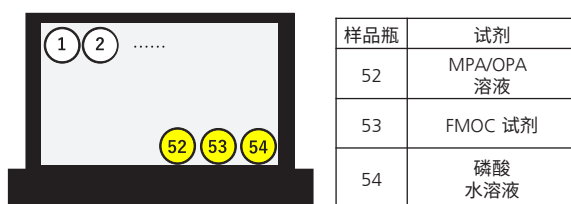


图 4 衍生化试剂的设置位置 (例: 1.5 mL 用样品盘)

本分析中使用的自动柱前衍生化流程如图 5 所示。为了执行上述动作，在自动进样器标配的自动预处理功能中的“预处理程序”模式下，按表 5 所示设置程序。其中，该程序设想的是各衍生化试剂按图 4 进行设置的情况。

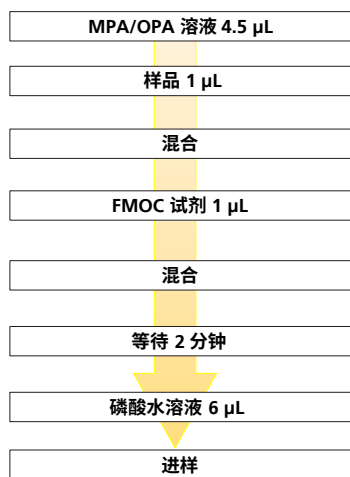


图 5 自动柱前衍生化流程

表 5 预处理程序详情

| 第 1 页 |              | 第 2 页 |                |
|-------|--------------|-------|----------------|
| 1     | a1=4.5       | 1     | vial.n 1,54    |
| 2     | a2=1         | 2     | n.strk ns      |
| 3     | a3=1         | 3     | aspir 6.0,ss   |
| 4     | a4=5.0       | 4     | n.drain        |
| 5     | vial.n 1,52  | 5     | d.rinse        |
| 6     | air.a 5.5,ss | 6     | inj.p          |
| 7     | n.strk ns    | 7     | s.inj          |
| 8     | aspir a1,ss  | 8     | purge.ml mv,rs |
| 9     | d.rinse      | 9     | purge.rp rv,rs |
| 10    | vial.n rn,sn | 10    | end            |
| 11    | n.strk ns    |       |                |
| 12    | aspir a2,ss  |       |                |
| 13    | air.a 1.0,ss |       |                |
| 14    | d.rinse      |       |                |
| 15    | n.drain      |       |                |
| 16    | for a5=1,10  |       |                |
| 17    | aspir a4,5.0 |       |                |
| 18    | disp a4,5.0  |       |                |
| 19    | next a5      |       |                |
| 20    | d.rinse      |       |                |
| 21    | wait 0.5     |       |                |
| 22    | vial.n 1,53  |       |                |
| 23    | n.strk ns    |       |                |
| 24    | aspir a3,ss  |       |                |
| 25    | air.a 2.0,ss |       |                |
| 26    | d.rinse      |       |                |
| 27    | n.drain      |       |                |
| 28    | for a5=1,40  |       |                |
| 29    | aspir a4,5.0 |       |                |
| 30    | disp a4,5.0  |       |                |
| 31    | next a5      |       |                |
| 32    | wait 2.0     |       |                |
| 33    | goto f2      |       |                |
| 34    | end          |       |                |

## 总结

本文介绍了使用自动预处理功能，通过柱前衍生化快速分析 20 种蛋白质构成氨基酸成分的案例。通过使用为 Nexera XR 优化的分析条件和预处理程序，可以简便地进行柱前衍生化氨基酸分析。此外，通过自动预处理，反应时间可以基本保持固定，实现更加稳定地分析。在本分析中使用的 Nexera XR 通用性高，还可以用于氨基酸之外的分析。因此，有望提高装置的工作效率，使氨基酸分析更加容易。

编写本应用新闻时，在分析条件构建方面获得了九州大学生物防御医学研究所附属跨组学中心代谢组学马场研究室的指导与协助。

岛津应用云



Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。



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: 2021 年 2 月