

使用 HPLC- 荧光检测器进行氨基酸自动柱前在线衍生的定量方法

01-00117-CN

大城 真爱

对用户的好处

- ◆ 氨基酸的定量结果重复性很好。
- ◆ 通过使用 Nexera XR 配置的自动预处理功能，可以简便地分析柱前衍生化氨基酸。
- ◆ 可在一个周期 24 分钟内完成 21 种氨基酸的分析。

简介

在食品、制药开发等的各种领域都需要分析氨基酸。因此，分析氨基酸时采用 HPLC- 荧光检测器、HPLC-UV 检测器、LC/MS、GC/MS 等各种方法，各具特色。

在本文中，介绍了使用 HPLC- 荧光检测器进行氨基酸自动柱前在线衍生的定量方法。

本文介绍将使用该条件的分析方法适用于定量氨基酸的案例。

分析条件

本分析中使用分析前已衍生化的氨基酸的柱前衍生方法。同时使用自动进样器配置的自动预处理功能，在线自动进行衍生化反应，稳定简便地进行分析。

图 1 所示为，以氨基酸构成蛋白质为中心，共计分析 21 种组分氨基酸的色谱图，表 1 所示为分析条件的概要。详见前文出现的应用新闻 L589。

表 1-1 分析条件

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

*1 : P/N 228-41624-92

表 1-2 梯度洗脱程序

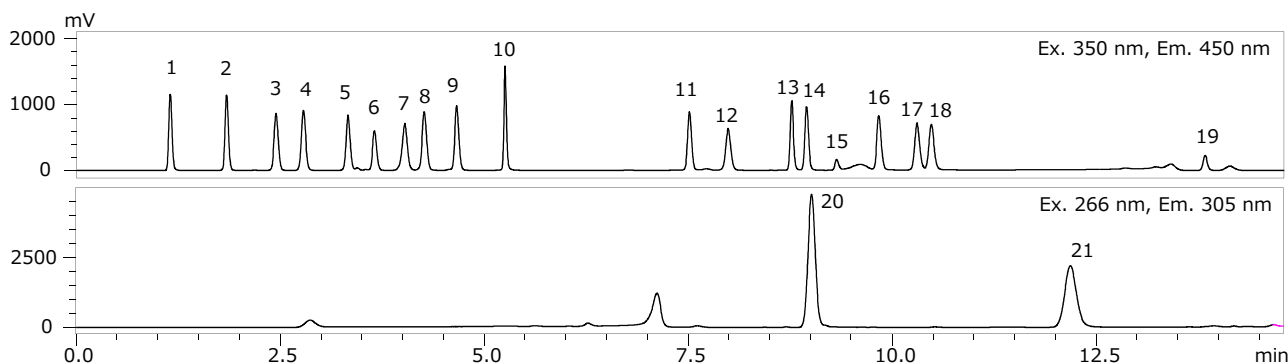
时间 (min)	A. 浓度	B. 浓度	C. 浓度
0	95	5	0
0.2	93	7	0
1	93	7	0
4	87	13	0
5	0	15	85
7.5	0	30	70
12	0	35	65
14	0	45	55
14.01	0	95	5
16.99	0	95	5
17	5	95	0
18	5	95	0

线性和重现性

各氨基酸在 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, 25μmol/L 浓度标样连续进样 (n=6) 的保留时间和峰面积的相对标准偏差如表 2 所示。

表 2 保留时间和峰面积结果 (%RSD, n=6)

	保留时间	面积		保留时间	面积
	(%RSD)	(%RSD)		(%RSD)	(%RSD)
Asp	0.46	0.55	GABA	0.07	0.73
Glu	0.14	0.57	Met	0.03	0.50
Asn	0.13	0.72	Val	0.04	0.52
Ser	0.11	0.53	Cys	0.03	0.84
Gln	0.08	0.72	Phe	0.03	0.50
His	0.07	2.49	Ile	0.04	0.44
Gly	0.08	0.75	Leu	0.05	0.43
Thr	0.08	0.68	Lys	0.03	3.85
Arg	0.10	3.07	Hy-Pro	0.03	3.13
Ala	0.05	0.77	Pro	0.04	5.09
Tyr	0.05	0.59			



1. 天冬氨酸 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. GABA 13. 蛋氨酸 14. 缬氨酸 15. 胱氨酸 16. 苯丙氨酸 17. 异亮氨酸 18. 亮氨酸 19. 赖氨酸 20. 羟脯氨酸 21. 脯氨酸

图 1 21 种氨基酸组分的同时分析 (各 25 μmol/L) 上: Ch1 (Ex. 350 nm, Em. 450 nm) 下: Ch2 (Ex. 266 nm, Em. 305 nm)

实际样品的定量结果

应用新闻 M310 中介绍了使用 GCMS-TQ™ 8040 NX 及 Smart Metabolites Database™, C238 中介绍了使用 LCMS-8060 NX 及 LC/MS/MS 方法包关于代谢物 ver. 2 的综合性分析食品所含组分的案例。其旨在区分食品的基础上,探索特殊组分。另一方面,掌握特殊组分后,使用本文介绍的方法可更加稳定简便地计算该差异的定量值。

与各条应用新闻相同,对 2 种番茄汁(有/无记载使用番茄的品种)、葡萄酒和无酒精葡萄酒进行了定量,结果如表 3、4 及图 2、3 所示。用水稀释了离心分离番茄汁后的上清液,用水稀释了葡萄酒和无酒精葡萄酒。

表 3 2 种番茄汁的定量值 (mmol/L)

	有记载使用品种	无记载使用品种		有记载使用品种	无记载使用品种
Asp	11.06	11.74	GABA	12.93	9.97
Glu	17.77	16.66	Met	0.30	0.31
Asn	6.53	6.80	Val	0.64	0.56
Ser	2.55	2.04	Cys	-	-
Gln	0.06	0.13	Phe	1.80	1.90
His	0.95	0.90	Ile	0.71	0.61
Gly	0.89	0.85	Leu	0.75	0.67
Thr	1.97	1.80	Lys	0.90	0.77
Arg	0.83	0.68	Hy-Pro	-	-
Ala	7.01	6.91	Pro	0.73	0.47
Tyr	0.46	0.44			

表 4 葡萄酒和无酒精葡萄酒的定量值 (mmol/L)

	葡萄酒	无酒精葡萄酒		葡萄酒	无酒精葡萄酒
Asp	0.67	0.56	GABA	1.12	2.69
Glu	0.64	0.86	Met	0.15	0.12
Asn	0.25	0.22	Val	0.43	0.40
Ser	0.43	0.74	Cys	-	-
Gln	0.00	0.00	Phe	0.34	0.36
His	0.27	0.44	Ile	0.19	0.18
Gly	0.83	0.20	Leu	0.51	0.37
Thr	0.42	0.69	Lys	0.56	0.23
Arg	0.35	6.74	Hy-Pro	0.25	0.05
Ala	1.74	2.20	Pro	41.06	6.77
Tyr	0.18	0.22			

各条应用新闻中有特征的组分与其他组分相比,定量值差异较大。

结论

本文介绍了将使用 HPLC- 荧光检测器进行氨基酸自动柱前在线衍生的分析方法适用于定量氨基酸的案例。

本系统在保留时间、峰面积上具有狼嚎的重复性,使您可以稳定使用。此外,还可以进行氨基酸的自动柱前在线衍生,因此使用简便。基于这些优点,在通过其他机型综合性地探索组分后,需要进行定量时,推荐您使用 HPLC- 荧光检测器。

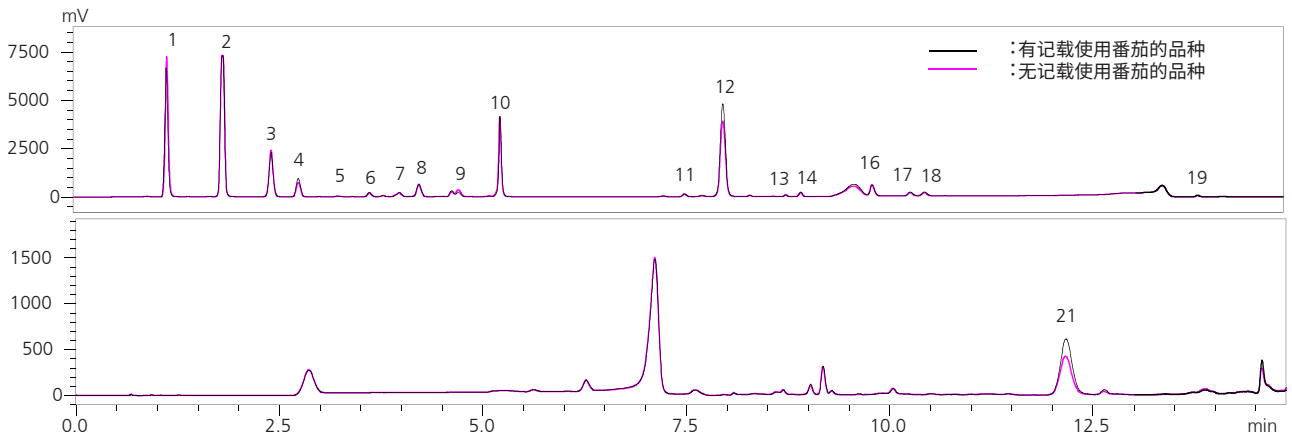


图 2 2 种番茄汁的色谱图
(上段: 各组 100 倍稀释样品在 Ch1 的分析结果、下段: 各组 100 倍稀释样品在 Ch2 的分析结果)

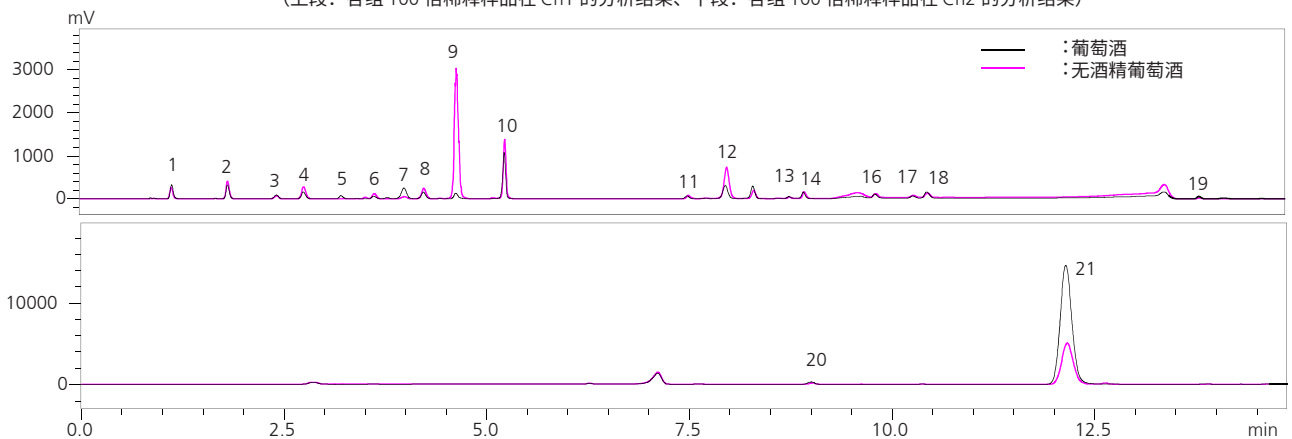


图 3 葡萄酒和无酒精葡萄酒的色谱图
(上段: 各组 100 倍稀释样品在 Ch1 的分析结果、下段: 100 倍及 200 倍稀释样品在 Ch2 的分析结果)

岛津应用云



Nexera、Shim-pack、GCMS-TQ 及 Smart Metabolites Database 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 3 月