

LC-2010的柱前衍生氨基酸分析

No.LC-005

摘要：柱前衍生氨基酸分析是先将氨基酸衍生成具有可见光吸收或荧光发射的衍生物，然后在反相柱上分离，它不需要柱后反应装置，因此可以在配有相应检测器的普通高效液相色谱仪上分析。使用LC-2010高效液相色谱仪，考察了柱前衍生法进行氨基酸分析时的精密度和稳定性。

关键词：HPLC 柱前衍生 氨基酸分析

HPLC分析条件

仪器：LC-2010系统

色谱柱：shim-pack VP-ODS(4.6mmID × 150mmL)

柱温：36℃

流动相：A：10mM磷酸缓冲盐(pH=6.9)

B：乙腈

A/B=85/15 1mL/min

流动相梯度洗脱程序：

检测波长：254nm

样品：2.00 μmol/mL标准氨基酸溶液

(中国农业科学院分析测试中心研制，17种组分)

进样体积：4 μL

流动相梯度洗脱程序：

TIME	FUNC	VALUE
30.00	B.CONC	64
30.01	B.CONC	100
34.00	B.CONC	100
34.01	B.CONC	15
40.00	Controller	STOP

柱前衍生步骤

1、200 μL样品中加入100mM异硫氰酸苯酯(乙腈溶液)100 μL和1M三乙胺(乙腈溶液)100 μL，室温下放置1小时。

2、反应液中加入400 μL己烷，振荡。

3、静置后，取下层液，一次性过滤器(0.45μm)过滤。

4、取滤液4 μL注入HPLC。

采用上述步骤同批衍生10个样品。

稳定性试验

取10份样品，连续进样测定，色谱图如图2。各组分保留时间RSD的最小值为0.32% (Phe)，最大值为1.98% (Glu)，各组分面积的RSD最小值为4.51% (Tyr)，最大值为13.82% (Asp)，见表2。

精密度试验

取同一份样品，连续测定6次，色谱图如图1。各组分保留时间RSD的最小值为0.06% (Lys)，最大值为0.29% (Pro)，各组分面积的RSD最小值为0.14% (Lle)，最大值为1.44% (Cys)，见表1。

结果讨论

1、精密度试验中，各组分保留时间的RSD<0.5%，峰面积的RSD<1.5%。由此数据说明，本次试验中，LC-2010系统的精密度比较好。

2、稳定性试验中，通过峰面积的RSD可以看到，Asp和Glu的稳定性不是太好，考虑到精密度的试验结果，这个差距应该是由衍生试验的误差引起的。

3、除去最先进样的两个样品，重新统计了保留时间和峰面积的RSD（见表3）。可以看出，峰面积的重复性没有变化，但是保留时间的重现性得到了一定程度的提高。因此认为，由于分析第一和第二个样品时，系统尚未完全稳定，导致了保留时间的漂移。

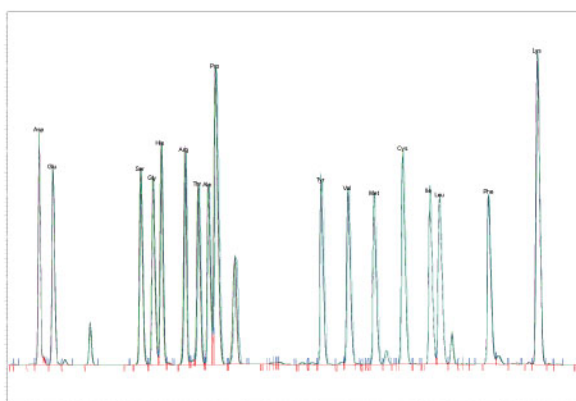


图1 精密度试验

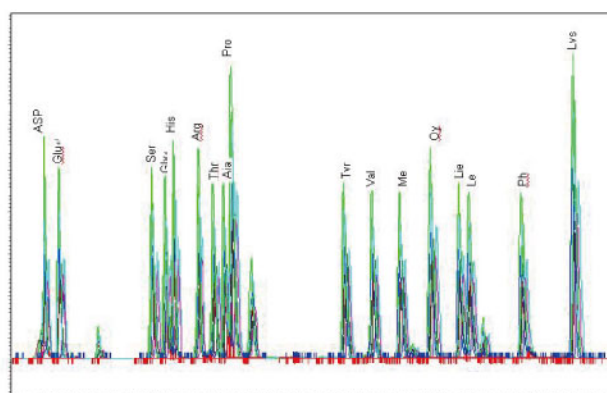


图2 稳定性试验

表1 精密度试验 (R=6次重复进样)

Name	Retention time	Area
	%RSD	%RSD
Asp	0.22	0.62
Glu	0.24	0.54
Ser	0.21	0.45
Gly	0.21	0.54
His	0.21	0.40
Arg	0.26	0.46
Thr	0.27	1.25
Ala	0.28	0.47
Pro	0.29	0.38
Tyr	0.19	0.25
Val	0.16	0.18
Met	0.15	0.41
Cys	0.11	1.44
Ile	0.08	0.14
Leu	0.07	0.24
Phe	0.06	0.39
Lys	0.06	0.44

表2 稳定性试验 (R=10个样品)

Name	Retention time	Area
	%RSD	%RSD
Asp	1.98	13.82
Glu	1.98	6.64
Ser	0.98	7.14
Gly	0.91	7.43
His	0.81	6.59
Arg	0.56	6.15
Thr	0.77	8.70
Ala	0.74	6.85
Pro	0.70	7.22
Tyr	0.49	4.50
Val	0.46	5.87
Met	0.42	5.42
Cys	0.45	6.68
Ile	0.35	5.50
Leu	0.34	5.23
Phe	0.32	5.38
Lys	0.32	6.55

表3 稳定性试验 (R=8个样品)

Name	Retention time	Area
	%RSD	%RSD
Asp	1.54	15.55
Glu	1.41	7.00
Ser	0.51	7.46
Gly	0.46	7.91
His	0.38	6.98
Arg	0.30	6.44
Thr	0.39	9.18
Ala	0.39	7.33
Pro	0.37	7.66
Tyr	0.30	4.61
Val	0.27	6.22
Met	0.25	5.70
Cys	0.24	6.75
Ile	0.18	5.76
Leu	0.18	5.22
Phe	0.16	5.79
Lys	0.17	6.93