

# LC-20A 氨基酸柱前自动在线衍生分析

## LC-114

**摘要：**本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 进行氨基酸柱前自动在线衍生的方法。使用二元高压梯度系统在 35 min 内完成 18 种氨基酸的衍生（包括两种二级氨基酸）。实验结果表明：18 种氨基酸的线性范围均为 25 nmol ~1000 nmol，相关系数均大于 0.9994。方法的定量限在 3.67~12.28 nmol 之间，检出限在 1.10~3.68 nmol 之间。50 nmol、1000 nmol 两个浓度标样连续 6 次进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.021~0.168% 和 1.422~3.555% 之间，仪器精密度良好。

**关键词：**LC-20A 氨基酸 在线衍生

氨基酸是构成生物体蛋白质以及生命活动有关的最基本的物质。氨基酸分析也是生命科学研究中最重要的技术之一。大多数氨基酸不含有生色团，为提高分析检测的灵敏度和分离选择的特性，常常需要对氨基酸进行衍生。国家标准对食品及饲料中氨基酸测定均采用柱后茚三酮衍生离子交换色谱法测定，分析时间长。近年来，柱前衍生反相高效液相色谱法已得到了广泛应用。本文采用 OPA-FMOC 柱前衍生法，对 18 种氨基酸进行了定量环内自动在线衍生的分析，结果显示，该法操作简便、重复性好、产物稳定。

### 实验条件

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 二元高压梯度系统。具体配置为 Prominence LC-20A 系统，包括 LC-20AD×2( 输液泵 )，SIL-20AC ( 自动进样

器，ROM 版本为 9.24)，CTO-20AC ( 柱温箱 )，CBM-20A( 系统控制器 )，DGU-20A3( 在线脱气机 )，SPD-20A( 紫外检测器，可进行双波长检测 ) 和 LCsolution( 工作站 )。

#### 1.2 分析条件

##### 液相色谱条件

色谱柱：GL InertSustain C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 3μm)

流动相：A：水 (40 mM 磷酸盐，PH=7.0)

B：乙腈/甲醇/水 (45:45:10)

进样体积：1 μL

检测波长：338 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%

柱温：40℃

流速：1.1 mL/min

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	12
2.50	Pumps	Pump B Conc.	12
2.51	Pumps	Pump B Conc.	16
13.00	Pumps	Pump B Conc.	36
13.01	Pumps	Pump B Conc.	38
25.00	Pumps	Pump B Conc.	100
28.00	Pumps	Pump B Conc.	100
28.01	Pumps	Pump B Conc.	10
35.00	Controller	Stop	

表2 氨基酸于SIL-20AC定量环内衍生的程序简述

vial 52	将进样针移动到52号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入52号瓶

表2 氨基酸于SIL-20AC定量环内衍生的程序简述

vial 52	将进样针移动到52号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入52号瓶
aspir 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 样品
vial 1	进样针移动到1号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm 的冲程插入1号瓶
aspir 2,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取2 $\mu\text{L}$ 样品
vial 53	进样针移动到53号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入53号瓶
vial 53	进样针移动到53号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入53号瓶
vial 2	进样针移动到2号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入2号瓶
aspir 2,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取2 $\mu\text{L}$ 样品
vial 53	进样针移动到53号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入53号瓶
vial 53	进样针移动到53号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入53号瓶
vial sn	进样针移动到指定的瓶号上方
n.strk 52	进样针以52 mm的冲程插入指定瓶
aspir iv,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取指定体积的样品
air.a 20,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取20 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出10 $\mu\text{L}$ 的空气
air.a 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出10 $\mu\text{L}$ 的空气
air.a 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出10 $\mu\text{L}$ 的空气
air.a 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出10 $\mu\text{L}$ 的空气
air.a 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出10 $\mu\text{L}$ 的空气
air.a 10,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度吸取10 $\mu\text{L}$ 的空气
disp 20,50	以50 $\mu\text{L/s}$ 的速度排出20 $\mu\text{L}$ 的空气
wait 1.5	等待1.5 min
vial 53	进样针移动到53号瓶上方
n.strk 52	进样针以52 mm 的冲程插入53号瓶
inj.p	进样针移动到进样口处
s.inj	开始进样
end	结束

其中1号瓶放置的是OPA和3-巯基丙酸体积比为1:1的混合液,2号瓶放置的是FMOC,52号瓶放置硼酸缓冲液,53号瓶放置水溶液(做洗液用),氨基酸标准液放在指定位置。

### 1.3 样品制备

衍生试剂配制方法: OPA 配制, 10 mg OPA 溶于 1 mL 溶液 (0.15 mL 无水乙醇 / 甲醇 + 0.15 mL 硼酸缓冲液 + 0.7 mL 纯水); FMOC 配制, 10 mg FMOC 溶于 1 mL 乙腈; 3-巯基丙酸, 10  $\mu$ L 3-巯基丙酸用纯水稀释至 1 mL; 硼酸缓冲液: 0.1 mol/L, 用 0.4 N 的氢氧化钠溶液调 pH 至 10。

标准物质: 共 18 中, L-丙氨酸、L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、瓜氨酸、谷氨酰胺。

标准溶液配制: 用 0.1 N 的稀盐酸将 2  $\mu$ mol 的混合标准储备液分别稀释成 25 nmol、50 nmol、100 nmol、500 nmol、1000 nmol 的混合标准工作液。

样品前处理方法: 取一片某品牌复合氨基酸片 (1.0 g / 片), 研碎后置入 25 mL 容量瓶中, 加入 2/3 的去离子水超声 1 h 后用去离子水定容至刻度。取清液经 0.22  $\mu$ m 针式滤器过滤后用 0.1 N 的稀盐酸稀释 10 倍进样。

## 实验结果

### 2.1 标准样品的色谱图

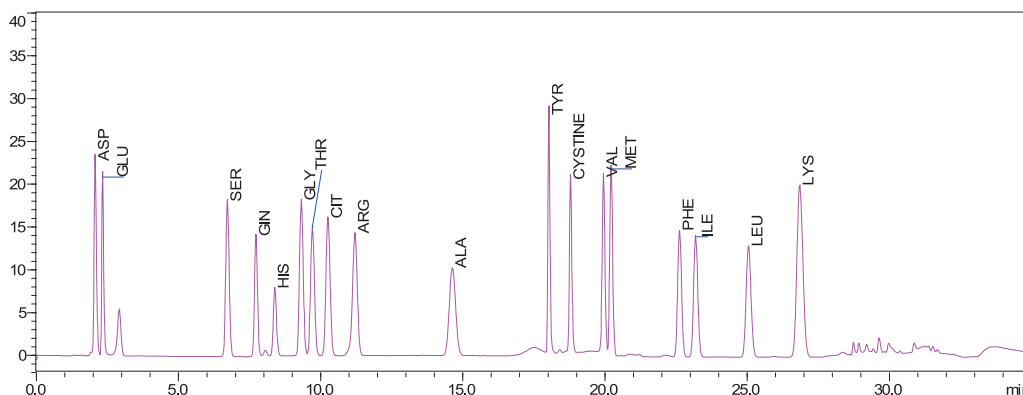


图1 氨基酸柱前在线衍生 (OPA, FMOC) 色谱图 (500 nmol, 338 nm)

### 2.2 线性关系

将 5 个不同浓度的标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 各组分校准曲线如下图所示, 线性方见表 3。

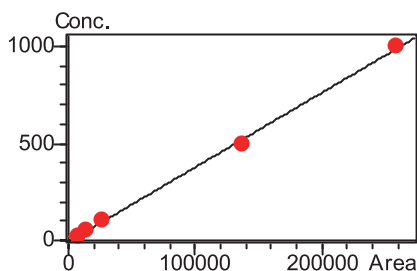


图2 ASP的标准工作曲线

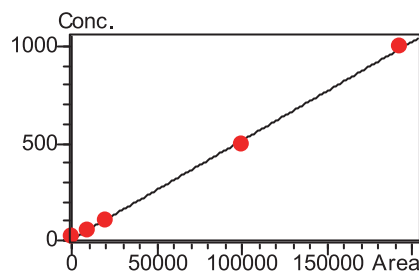


图3 GLU的标准工作曲线

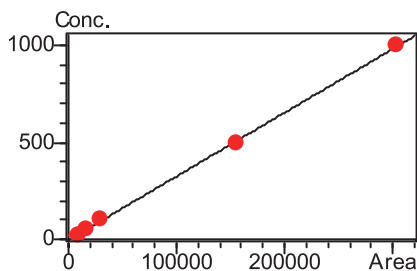


图4 SER的标准工作曲线

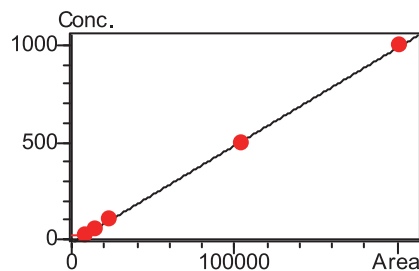


图5 GIN的标准工作曲线

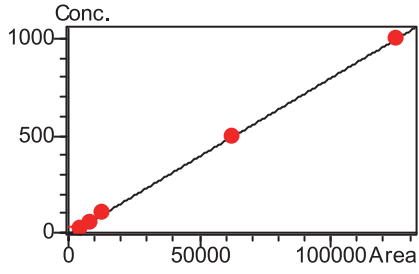


图6 HIS的标准工作曲线

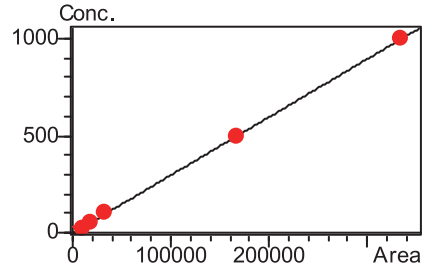


图7 GLY的标准工作曲线

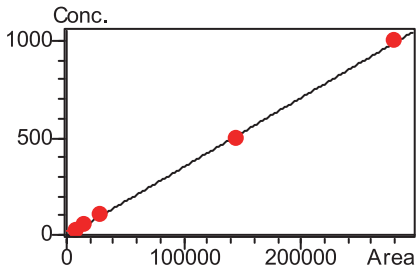


图8 THR的标准工作曲线

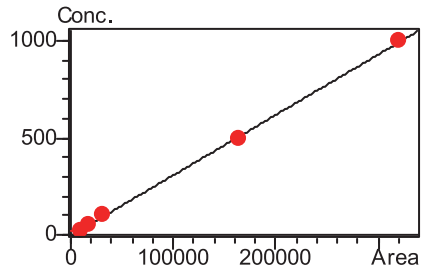


图9 CIT的标准工作曲线

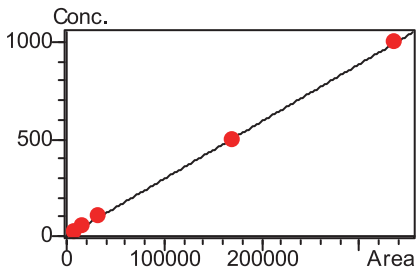


图10 ARG的标准工作曲线

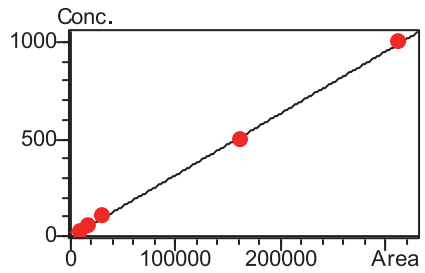


图11 ALA的标准工作曲线

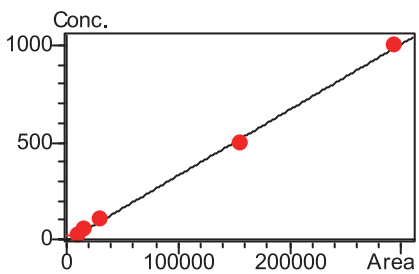


图12 TYR的标准工作曲线

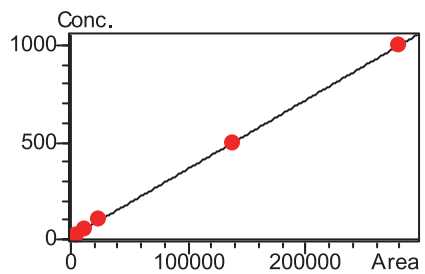


图13 CYSTINE的标准工作曲线

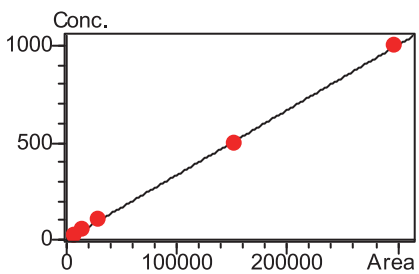


图14 VAL的标准工作曲线

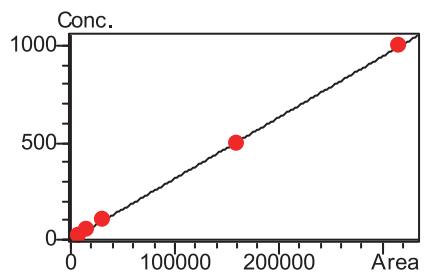


图15 MET的标准工作曲线

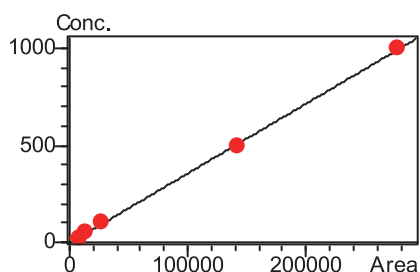


图16 PHE的标准工作曲线

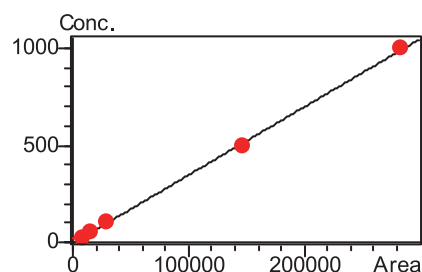


图17 ILE的标准工作曲线

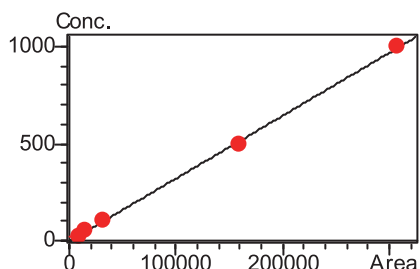


图18 LEU的标准工作曲线

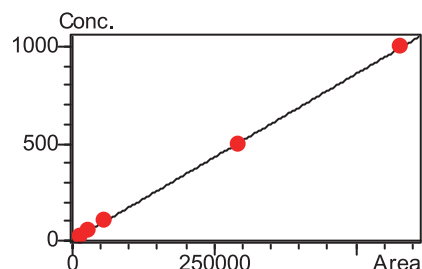


图19 LYS的标准工作曲线

表3 十八种氨基酸的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r
1	ASP	$Y = (0.00384402)X + (-6.89804)$	0.9996
2	GLU	$Y = (0.00510315)X + (5.80195)$	0.9994
3	SER	$Y = (0.00328467)X + (-3.18595)$	0.9999
4	GIN	$Y = (0.00503219)X + (-21.1866)$	0.9999
5	HIS	$Y = (0.00808042)X + (-10.7327)$	0.9998
6	GLY	$Y = (0.00299609)X + (-2.63867)$	0.9996
7	THR	$Y = (0.00356893)X + (-6.00434)$	0.9995
8	CIT	$Y = (0.00311007)X + (-3.41066)$	0.9999
9	ARG	$Y = (0.00296260)X + (-0.882932)$	0.9999
10	ALA	$Y = (0.00318606)X + (-3.36042)$	0.9997
11	TYR	$Y = (0.00339032)X + (-9.32088)$	0.9999
12	CYS	$Y = (0.00353943)X + (11.3614)$	0.9998
13	VAL	$Y = (0.00334639)X + (-0.0111576)$	0.9999
14	MET	$Y = (0.00315160)X + (0.162040)$	0.9999
15	PHE	$Y = (0.00359160)X + (-3.05790)$	0.9999
16	ILE	$Y = (0.00351343)X + (-4.20243)$	0.9995
17	LEU	$Y = (0.00323784)X + (-3.05340)$	0.9998
18	LYS	$Y = (0.00171827)X + (0.487108)$	0.9999

### 2.3 灵敏度

用 0.1 N 的稀盐酸稀释得到浓度为 25 nmol 的溶液进样分析，氨基酸的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 4 所示。

表4 八种物质的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(nmol)	定量限(nmol)
1	ASP	51.47	1.46	4.90
2	GLU	20.36	3.68	12.28
3	SER	43.85	1.71	5.70
4	GIN	35.98	2.08	6.95
5	HIS	20.48	3.66	12.02
6	GLY	42.85	1.75	5.83
7	THR	40.77	1.84	6.13
8	CIT	37.03	2.03	6.75
9	ARG	31.53	2.38	7.93
10	ALA	23.64	3.17	10.58
11	TYR	68.04	1.10	3.67
12	CYS	37.36	2.01	6.69
13	VAL	48.27	1.55	5.18
14	MET	47.70	1.57	5.24
15	PHE	34.12	2.20	7.33
16	ILE	32.89	2.28	7.60
17	LEU	30.01	2.50	8.33
18	LYS	45.61	1.64	5.48

#### 2.4 精密度实验

取标准工作液中 50 nmol、1000 nmol 两个浓度，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.021~0.168% 和 1.422~3.555% 之间，仪器精密度良好。

表5 保留时间与峰面积结果 (%RSD, n=6)

Name	50 nmol		1000nmol	
	RT	Area	RT	Area
ASP	0.049	2.413	0.066	2.880
GLU	0.042	3.530	0.029	2.733
SER	0.108	2.232	0.059	2.674
GIN	0.109	3.085	0.063	2.517
HIS	0.122	1.422	0.066	1.561
GLY	0.142	1.634	0.078	2.122
THR	0.123	2.484	0.057	2.764
CIT	0.161	2.383	0.087	2.514

ARG	0.157	1.845	0.089	2.292
ALA	0.143	3.555	0.084	2.656
TYR	0.042	1.680	0.021	3.063
CYS	0.067	1.752	0.029	2.527
VAL	0.075	2.899	0.046	2.959
MET	0.083	2.218	0.050	2.764
PHE	0.097	2.321	0.100	3.067
ILE	0.094	2.415	0.105	2.874
LEU	0.097	2.297	0.117	2.760
LYS	0.139	2.158	0.168	2.801

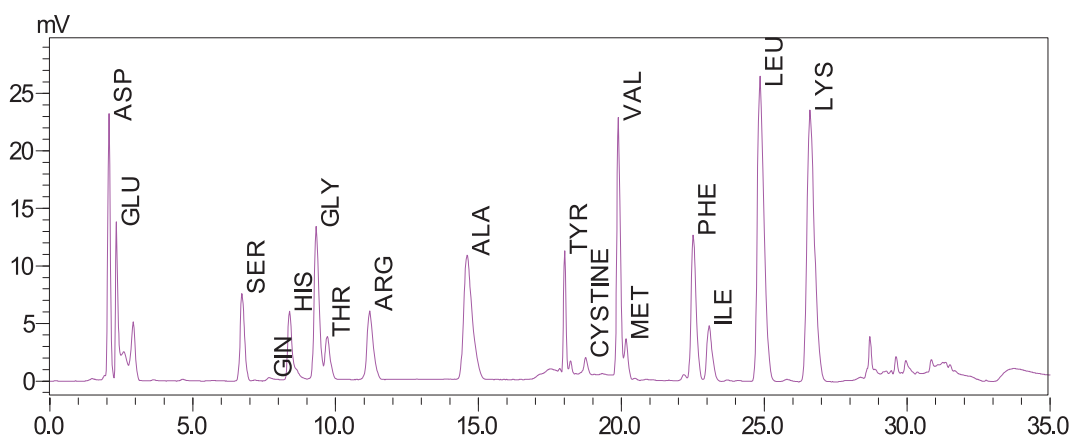


图20 市售氨基酸片检测色谱图 (稀释10倍)

表6 市售氨基酸片检测结果

	测量值 (nmol/g)	实际值 (测量值×10, nmol/g)
ASP	1417.25	14172.5
GLU	11177.75	111777.5
SER	6588	65880
GIN	179	1790
HIS	13721.75	137217.5
GLY	12013	120130
THR	4009.75	40097.5
CIT	—	—
ARG	6637.75	66377.5
ALA	17787.25	177872.5
TYR	5662.75	56627.5
CYS	2853.5	28535
VAL	16995.75	169957.5

MET	2512	25120
PHE	13974.75	139747.5
ILE	5515.75	55157.5
LEU	34687.75	346877.5
LYS	18728	187280

## 实验总结和讨论

本文利用 SIL-20AC 进行了 18 种氨基酸混标的在线衍生，结果显示所有氨基酸的线性范围均为 25 nmol ~1000 nmol，相关系数均大于 0.9994。方法的定量限在 3.67~12.28 nmol 之间，检出限在 1.10~3.68 nmol 之间。保留时间和峰面积的 %RSD 值分别在 0.021~0.168 和 1.422~3.555 之间。证明利用 LC-20A Prominence 系统进行 OPA- FMOc 氨基酸柱前在线衍生分析具有快速、准确、重复性好等特点，可以很好地完成一级和二级氨基酸的柱前自动在线衍生。

附录：

氨基酸标准品信息表

氨基酸	简称	CAS
天门冬氨酸	ASP	56-84-8
谷氨酸	GLU	56-86-0
丝氨酸	SER	56-45-1
谷氨酰胺	GIN	56-85-9
组氨酸	HIS	71-00-1
甘氨酸	GLY	56-40-6
苏氨酸	THR	72-19-5
瓜氨酸	CIT	372-75-8
精氨酸	ARG	74-79-3
丙氨酸	ALA	56-41-7
酪氨酸	TYR	60-18-4
半胱氨酸	CYS	52-90-4
缬氨酸	VAL	72-18-4
蛋氨酸	MET	63-68-3
苯丙氨酸	PHE	63-91-2
异亮氨酸	ILE	73-32-5
亮氨酸	LEU	61-90-5
赖氨酸	LYS	56-87-1