

18 种氨基酸分析方法

一. 仪器及试剂

仪 器:

- 1). 天平一台（精度 0.1mg）；
- 2). 恒温水浴锅一台；
- 3). 容量瓶；
- 4). 试管（1.5×15cm 或 1.5×10cm）；
- 5). 微量进样器（5 μ L 或 10 μ L）一支；
- 6). 微量可调移液枪（1000 μ L，200 μ L）一支、吸头多个；
- 7). 旋涡混匀器一台；
- 8). HPLC 系统及氨基酸分析专用柱（4.6×250mm 5 μ m）；

试 剂:

- 1). 超纯水（ $\geq 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）；
- 2). 乙腈（HPLC 级）；
- 3). 三水合醋酸钠（分析纯）；
- 4). 冰醋酸（分析纯）；
- 5). 衍生试剂 A 和衍生试剂 B 溶液，至于冰箱保存（衍生试剂包对身体有害，用时请做好防护措施）；
- 6). 正己烷（HPLC 级）。
- 7). 0.1mol/L 盐酸溶液：量取 9.0mL 浓盐酸，加去离子水稀释至 1000mL。
- 8). 正亮氨酸内标溶液：称取正亮氨酸约 10mg，加 0.1mol/L 盐酸溶液 10mL 溶解，混匀。

二. 流动相的配制

流动相 A： 0.1mol/L 醋酸钠溶液（pH 6.5）： 乙腈=93.0： 7.0

配制方法：准确称取三水合醋酸钠 13.6g 于 1000mL 水中，搅拌均匀，使之溶解，用冰醋酸或氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.50；准确量取配制好的三水合醋酸钠溶液 930mL 和乙腈 70mL，混合均匀，抽滤过 0.22μm 滤膜；

流动相 B：水：乙腈=20.0：80.0

配制方法：准确量取水 200mL 和乙腈 800mL，混合均匀，抽滤过 0.22μm 滤膜；

三. 衍生化反应

1. 对照品溶液浓度值

Name	M.W.	C(Mmol/L)	Name	M.W.	C(Mmol/L)
门冬氨酸	133.10	2.50	胱氨酸	240.3	1.25
谷氨酸	147.13	2.50	氯化铵	53.49	2.50
丝氨酸	105.09	2.50	酪氨酸	181.19	2.50
甘氨酸	75.067	2.50	缬氨酸	117.15	2.50
组氨酸	155.15	2.50	蛋氨酸	149.21	2.50
精氨酸	174.20	2.50	异亮氨酸	131.17	2.50
苏氨酸	119.12	2.50	亮氨酸	131.17	2.50
丙氨酸	89.093	2.50	苯丙氨酸	165.19	2.50
脯氨酸	115.13	2.50	赖氨酸	146.19	2.50

2. 供试品溶液制备

精密量取/称取供试品适量，并配制成相应浓度的溶液备用。

3. 衍生步骤

- 1) 分别将 A、B 两种衍生试剂用稀释剂稀释至原来浓度的 1/5 倍；
- 2) 精密量取上述对照品溶液 160μL，置于试管中，加入稀释后的 A 溶液 100μL 和稀释后的 B 溶液 100 μ L，摇匀，室温反应 60min；然后加入正己烷溶液 400μL 旋紧盖子后振摇 5~10s，室温静置分层，取下层 200μL 溶液，加入 800 μ L 水混合均匀，再取 200μL 加入 800 μ L 水混合均匀，用孔径为 0.22μm 有机膜过滤，待分析；
- 3) 供试品的衍生步骤与对照品相同，样品衍生后稀释体积可根据样品中氨基酸含量适当稀释。
(注意：供试品样品前处理采用酸解提取，需要在衍生之前进行酸挥干处理，供试品中酸性强度过大在衍生过程中会发生中和，衍生过程必须在碱性条件下，才能够起到衍生化完全。)

四. 色谱条件

1. 色谱柱：月旭 Amino Acid，5 μ m，4.6×250mm；

2. 梯度程序:

流动相 A: 0.1mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6.50) : 乙腈=93: 7

流动相 B: 水: 乙腈=20: 80

T(min)	A%	B%
0.01	100.0	0.0
11	93.0	7.0
13.9	88.0	12.0
14	85.0	15.0
29	66.0	34.0
32	30.0	70.0
35	0.0	100.0
42	0.0	100.0
45	100.0	0.0
60	100.0	0.0

流 速: 1.0mL/min

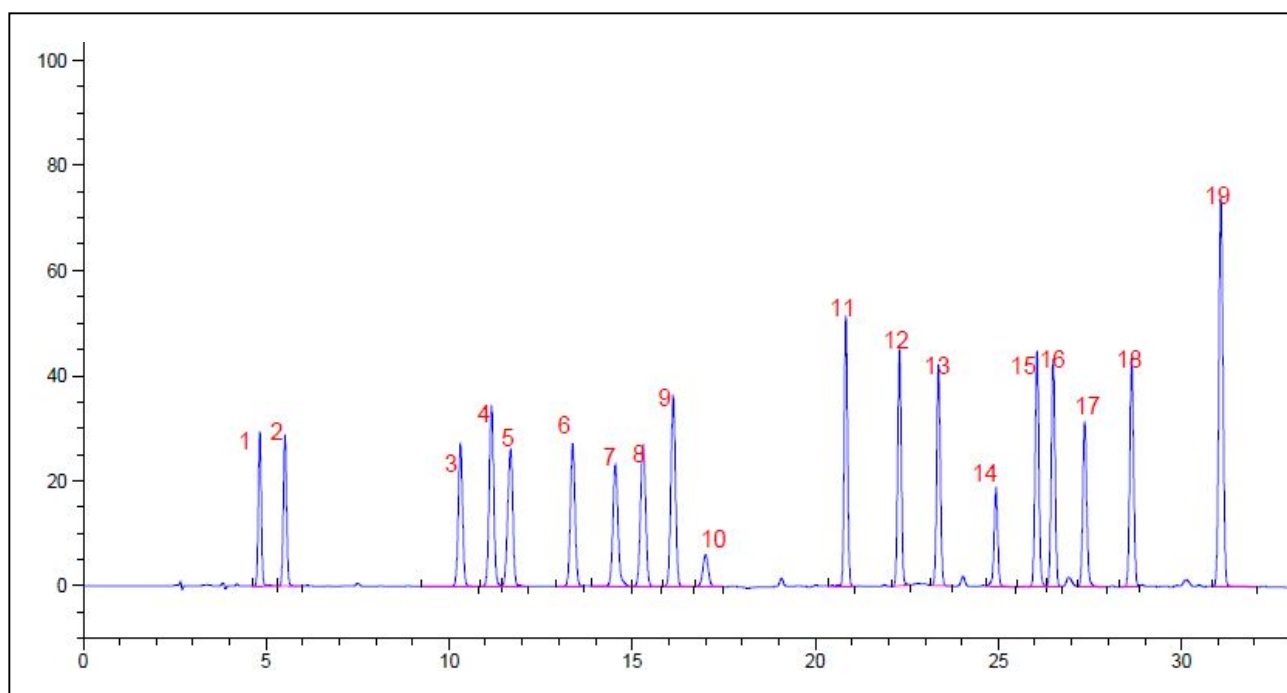
柱 温: 40℃

波 长: 254nm

进样量: 10μL

工作站记录时间: 60min

色谱图:



- | | | |
|---------|---------|----------|
| 1. 门冬氨酸 | 8. 丙氨酸 | 15. 异亮氨酸 |
| 2. 谷氨酸 | 9. 脯氨酸 | 16. 亮氨酸 |
| 3. 丝氨酸 | 10. 氯化铵 | 17. 正亮氨酸 |
| 4. 甘氨酸 | 11. 酪氨酸 | 18. 苯丙氨酸 |
| 5. 组氨酸 | 12. 缬氨酸 | 19. 赖氨酸 |
| 6. 精氨酸 | 13. 蛋氨酸 | |
| 7. 苏氨酸 | 14. 胱氨酸 | |

五. 操作步骤和注意事项

1. 操作步骤:

- 1) 设置柱温 40℃ 和流速 1.0mL/min;
- 2) 将 A、B 两个通道用乙腈: 水=20: 80 排尽气泡 (如 B 通道的原存留液中不含缓冲盐, 则无需用乙腈: 水=20: 80 排气泡), B 通道用流动相 B 再排尽气泡;
- 3) 用乙腈: 水=20: 80 (A 通道) 冲洗系统 20min, 以防止缓冲盐析出;
- 4) A 通道用流动相 A 排尽气泡, 然后用流动相 A 走基线 30min, 平衡色谱柱;
- 5) 运行一次空白梯度;
- 6) 进样分析;
- 7) 分析完成后:
 - I) 用乙腈: 水=20: 80 代替流动相 A, 进水样 (清洗自动进样器), 进行梯度洗脱;
 - II) 换 90% 乙腈冲洗色谱柱 40min 以上;

2. 注意事项:

- 1) 进样分析: 先进对照品溶液, 后进供试品溶液;
- 2) 缓冲溶液, 隔天需重新配制;
- 3) 防止缓冲盐析出。