

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（5μL或10μL）一支
- 6) 微量可调移液枪（1000μL，200μL）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 5μm）

试剂：

- 1) 超纯水（≥18MΩ·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(μmol/mL)	Name	M.W.	C(μmol/mL)
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

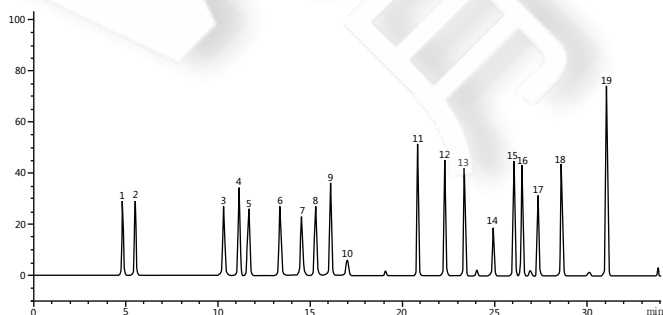
- 1) 分别将A、B两种衍生试剂用稀释剂稀释至原来浓度的1/5倍；
- 2) 精密量取上述对照品溶液160 μ L，置于试管中，加入稀释后的A溶液100 μ L和稀释后的B溶液100 μ L，摇匀，室温反应60min；然后加入正己烷溶液400 μ L旋紧盖子后振荡5~10s，室温静置分层，取下层200 μ L溶液，加入800 μ L水混合均匀，再取200 μ L加入800 μ L水混合均匀，用孔径为0.22 μ m有机膜过滤，待分析；
- 3) 供试品的衍生步骤与对照品相同，样品衍生后稀释体积可根据样品中氨基酸含量适当稀释。
(注意：供试品样品前处理采用酸解提取，需要在衍生之前进行酸挥发处理，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 \times 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 $^{\circ}$ C
波长：254nm
进样量：10 μ L
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 $^{\circ}$ C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。