

用 Gemini C18 对氨基酸的高分辨检测

以下方法是用 Gemini 液相柱 (5um 110A 150*4.6mm) 在单一操作中用 49 分钟完成了 31 种氨基酸的检测。事实证明这方法有非常好的分辨力, 并且能对半胱氨酸及高胱氨酸进行定量。这些要在用碘醋酸封上巯醇后, 用邻苯二甲醛衍生。先用巯基丙酸还原后才能接上“硫桥”。这也能对胱氨酸及高胱氨酸进行间接定量。脯氨酸必须要用9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 才能定量。组氨酸有 2 个信号峰 (图 1 分别为峰 8, 22), 这是因为碘醋酸与环内 N 原子发生反应, 但这些对定量无任何影响。

方法:

仪器: Agilent 1100 系列液相色谱仪

柱子: **Phenomenex Gemini (5u 110 A 150*4.6mm)**及 **Gemini 保护柱**

试剂:

缓冲盐: 0.4N 硼酸盐缓冲液, PH10.2(用 NaOH 调节)

OPA 试剂: Agilent 公司 (货号: 50613335)

OPA 试剂替代品;10mg 邻苯二甲醛

6.5ul 巯基丙酸 (MCP)

500ul 甲醇

500ul 硼酸盐

还原试剂: MCP(2.5ul 溶于 1ml 硼酸盐缓冲液)

封基试剂: 碘醋酸 (6.5mg 溶于 1ml 硼酸盐缓冲液)

FMOC 试剂: Agilent 公司 (货号: 50613337)

自动进样器设置:

1. 吸取 0.4ulMCP
2. 吸取 0.5ul 样品
3. 在空气中把这 0.9ul 溶液以最大速度混合 3 次
4. 稍等 0.5 分钟

5. 吸取 0.1u Iodessigsäure (碘乙酸)
6. 在空气中把这 1.0ul 溶液以最大速度混合 3 次
7. 稍等 0.5 分钟
8. 吸取 3.0ul 缓冲盐溶液
9. 吸取 0.5ul OPA 溶液
10. 在空气中把这 4.5ul 溶液以最大速度混合 3 次
11. 吸取 0.5ul FMOC 溶液
12. 在空气中把这 5.0ul 溶液以最大速度混合 3 次
13. 吸取 32.5ul Milli Q (超纯水)
14. 在空气中把这 37.5ul 溶液以最大速度混合 3 次
15. 进样

备注：在每次衍生后都要清洗自动进样针，由此降低样品之间的交叉影响。

色谱条件：

淋洗液 A:40mM NaH₂PO₄, pH7.8

淋洗液 B: 乙腈/甲醇/水 (45: 45: 10)

流速: 1ml/min

温度: 40℃

梯度洗脱：

时间 (分)	淋洗液 B(%)
0	0
40.5	40.5
41	61
43	61
44	82
44.5	100
46.5	100
47	0
49	0

荧光检测器设置:

时间 (分)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
0	340	450
43.5	266	305

表 1: 用 Gemini 分离的氨基酸

峰序号 氨基酸

1 天冬氨酸	2 谷氨酸	3 半胱氨酸	4 天冬酰胺	5 丝氨酸
6 高胱氨酸	7 谷氨酰胺	8 组氨酸	9 高丝氨酸	10 甘氨酸
11 苏氨酸	12 瓜氨酸	13 精氨酸	14 β -丙氨酸	15 丙氨酸
16 γ -氨基丁酸	17 O-乙酰化丝氨酸	18 酪氨酸	19 O-乙酰化高丝氨酸	
20 α -氨基丁酸	21 LL-胱硫醚	22 组氨酸 (碘醋酸)	23 缬氨酸	24 蛋氨酸
25 正缬氨酸	26 色氨酸	27 苯丙氨酸	28 异亮氨酸	29 鸟氨酸
30 亮氨酸	31 赖氨酸	32 脯氨酸		

Result:

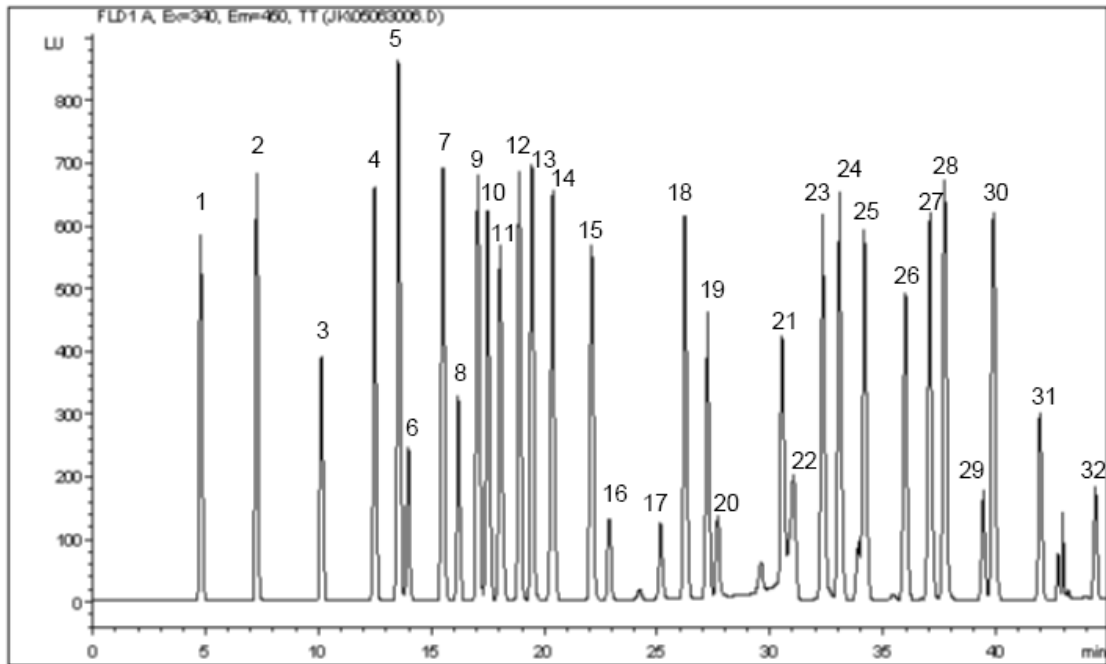


Figure 1: chromatogram of an amino acid standard. (see table1.)