

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（≥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 0.22 μ m 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 0.22 μ m 滤膜;

三. 衍生化反应

1. 对照品溶液浓度值

Name	M.W.	C(μ mol/mL)	Name	M.W.	C(μ mol/mL)
门冬氨酸	133.10	2.50	胱氨酸	240.3	1.25
谷氨酸	147.13	2.50	羟脯氨酸	131.13	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 旋紧盖子后振摇 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 \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

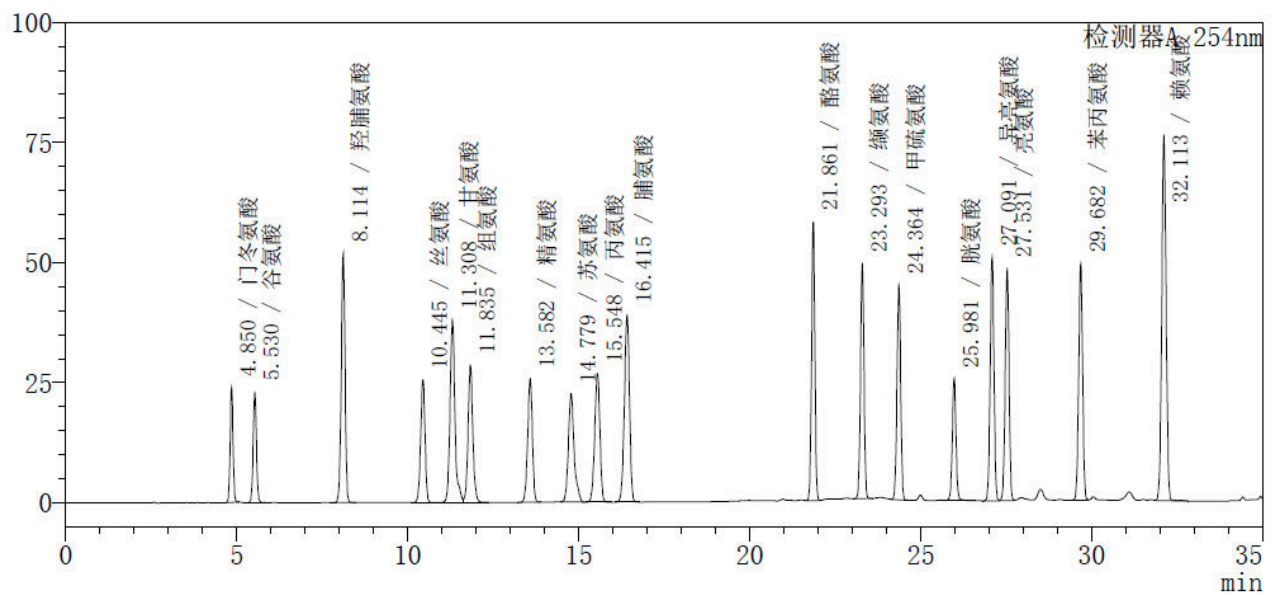
柱 温： 40 $^{\circ}$ C

波 长： 254nm

进样量： 10 μ L

工作站记录时间： 60min

色谱图：



<峰表>

检测器A 254nm

峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数(USP)	分离度(USP)	拖尾因子
1	门冬氨酸	4.850	140266	2.390	23940	13420	--	1.034
2	谷氨酸	5.530	154445	2.631	23129	14151	3.846	1.011
3	羟脯氨酸	8.114	398543	6.790	51938	23398	12.984	0.962
4	丝氨酸	10.445	226083	3.852	25480	29681	10.254	0.952
5	甘氨酸	11.308	379639	6.468	37917	31002	3.456	1.253
6	组氨酸	11.835	274892	4.683	28539	33841	2.047	1.071
7	精氨酸	13.582	246859	4.206	25693	43061	6.730	0.941
8	苏氨酸	14.779	262900	4.479	22544	39629	4.284	1.225
9	丙氨酸	15.548	283799	4.835	26750	46468	2.630	0.951
10	脯氨酸	16.415	405091	6.901	39015	53975	3.034	0.951
11	酪氨酸	21.861	389631	6.638	58117	214395	23.102	0.989
12	缬氨酸	23.293	350686	5.974	49098	217433	7.373	0.989
13	甲硫氨酸	24.364	336207	5.728	44685	216567	5.231	0.979
14	胱氨酸	25.981	190561	3.246	25487	259818	7.825	1.005
15	异亮氨酸	27.091	390148	6.647	50638	256089	5.309	0.981
16	亮氨酸	27.531	376017	6.406	48397	260135	2.049	0.978
17	苯丙氨酸	29.682	394842	6.727	49194	285073	9.813	0.974
18	赖氨酸	32.113	669289	#####	75968	276017	10.417	1.024
总计			5869898	#####	#####			

转换-核壳柱测定方法:

色谱柱: 月旭 BoltimateC18, 2.7 μ m, 4.6×150mm;

T(min)	A%	B%
0.01	100.0	0.0
7.0	93.0	7.0
8.3	88.0	12.0
8.4	85.0	15.0
17.5	66.0	34.0
19	30.0	70.0
21	0.0	100.0
25	0.0	100.0
27	100.0	0.0
35	100.0	0.0

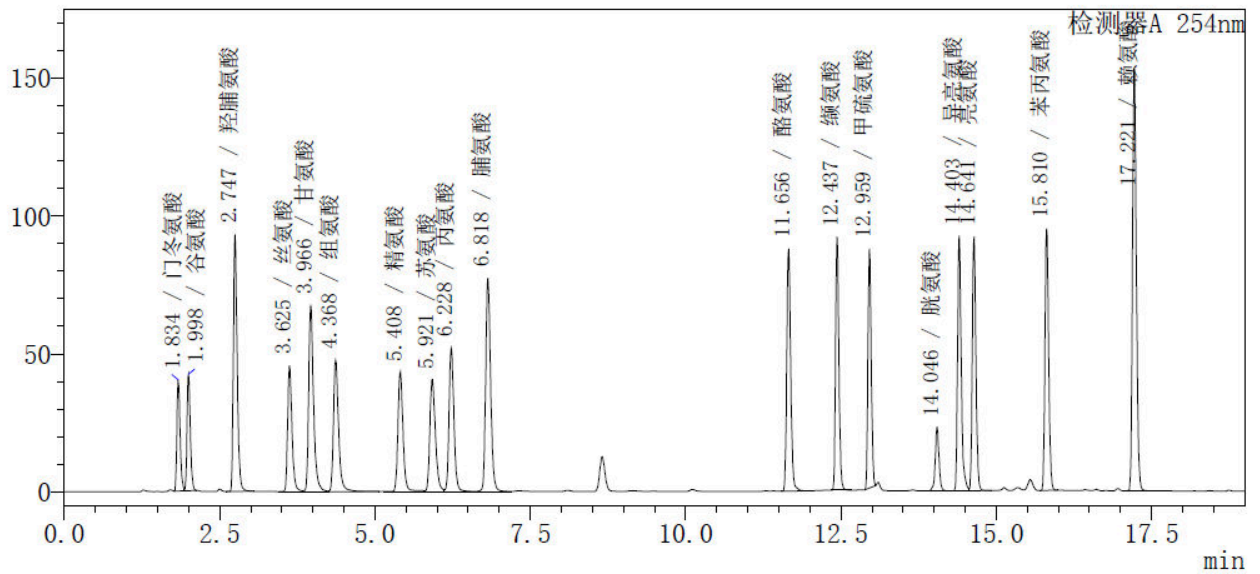
流 速：1.0mL/min

柱 温：40℃

波 长：254nm

进样量：10μL

色谱图：



〈峰表〉

检测器A 254nm

峰号	化合物名	保留时间	面积	面积%	高度	理论塔板数(USP)	分离度(USP)	拖尾因子
1	门冬氨酸	1.834	141177	2.474	40103	4571	—	1.318
2	谷氨酸	1.998	151024	2.647	41817	5631	1.526	1.333
3	羟脯氨酸	2.747	394768	6.919	93191	7539	6.431	1.338
4	丝氨酸	3.625	222651	3.902	45737	10481	6.544	1.326
5	甘氨酸	3.966	366685	6.427	67783	10995	2.330	1.419
6	组氨酸	4.368	272935	4.784	47707	12323	2.601	1.350
7	精氨酸	5.408	247103	4.331	43395	18568	6.578	1.189
8	苏氨酸	5.921	253494	4.443	40619	18441	3.085	1.325
9	丙氨酸	6.228	282467	4.951	52009	25721	1.860	1.198
10	脯氨酸	6.818	426000	7.467	77361	30352	3.782	1.234
11	酪氨酸	11.656	386201	6.769	87917	126197	33.627	1.204
12	缬氨酸	12.437	343859	6.027	91494	193090	6.390	1.225
13	甲硫氨酸	12.959	319524	5.600	86785	205789	4.585	1.184
14	胱氨酸	14.046	97476	1.708	23104	211056	9.193	0.988
15	异亮氨酸	14.403	381559	6.688	92464	227830	2.935	1.379
16	亮氨酸	14.641	369422	6.475	92081	229225	1.955	1.193
17	苯丙氨酸	15.810	389850	6.833	94861	254941	9.449	1.192
18	赖氨酸	17.221	659276	11.555	152815	298873	11.229	1.191
总计			5705471	100.000	1271242			

结论:

本次实验目的, 为了食品中的氨基酸测定, 加速出峰时间调分离度, 和样品灵敏度实验, 调整实验方法, 采用 Boltimate 4.6*150mm 2.7 μ m 核壳色谱柱进行测定, 从原来方法 60min, 提前到 35min 能够完成 18 种氨基酸测定。相同进样体积测定氨基酸含量响应值比较, 灵敏度实验增加 50%左右, 可以提高微量氨基酸测定, 或者微量物质测定。

五. 操作步骤和注意事项

1. 操作步骤:

- 1) 设置柱温 40°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。

报告签字:

测试: 张厚才

审核: 陈再洁

日期: 2016-12-28

日期: 2016-12-28