

# 18 种氨基酸定位及实验验证

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

### 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。

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ m 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. 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 $\mu$ L，置于试管中，加入稀释后的 A 溶液 100 $\mu$ L 和稀释后的 B 溶液 100  $\mu$  L，摇匀，室温反应 60min；然后加入正己烷溶液 400 $\mu$ L 旋紧盖子后振摇 5~10s，室温静置分层，取下层 200 $\mu$ L 溶液，加入 800  $\mu$  L 水混合均匀，再取 200 $\mu$ L 加入 800  $\mu$  L 水混合均匀，用孔径为 0.22 $\mu$ 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： Amino Acid, 5  $\mu$  m, 4.6 $\times$ 250mm；

## 2. 梯度程序:

流动相 A: 0.1mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6.5) : 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°C

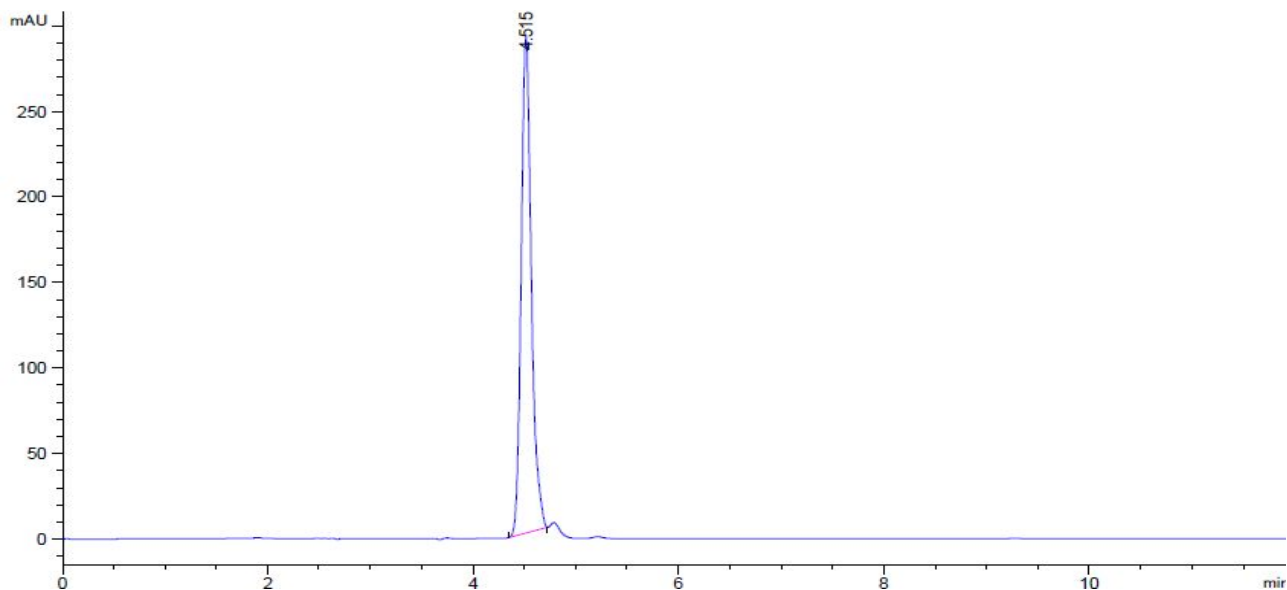
波 长: 254nm

进样量: 5 $\mu$ l

工作站记录时间: 60min

## 3. 氨基酸单标

### 1、门冬氨酸

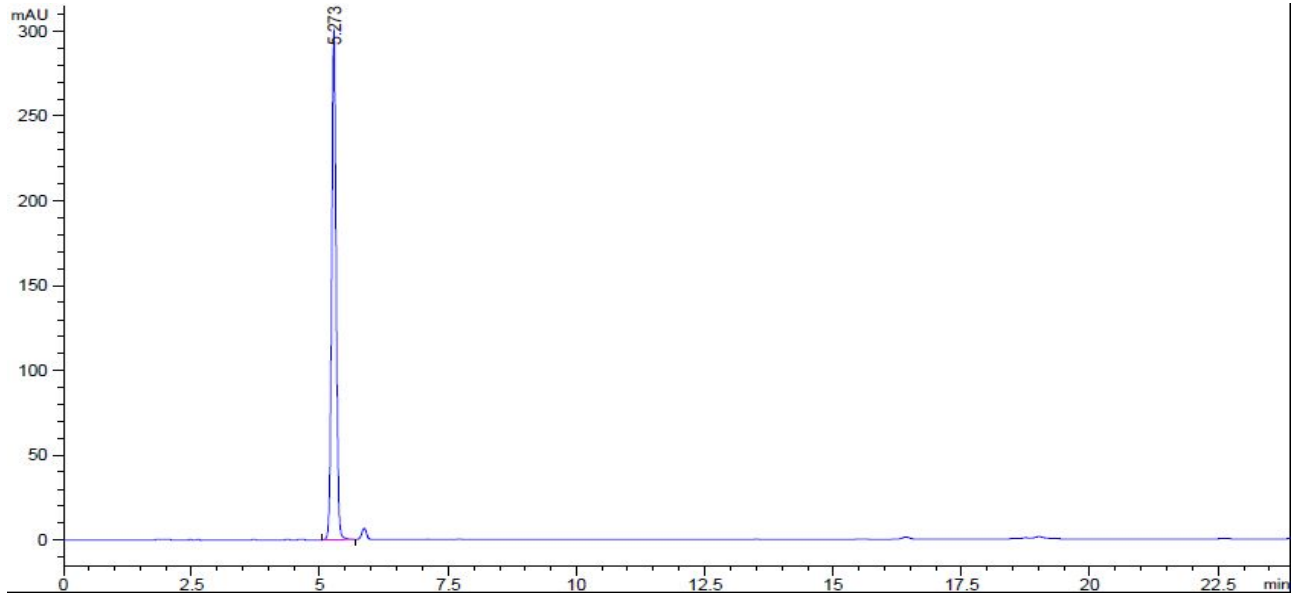




月旭科技 Welch Materials, Inc.

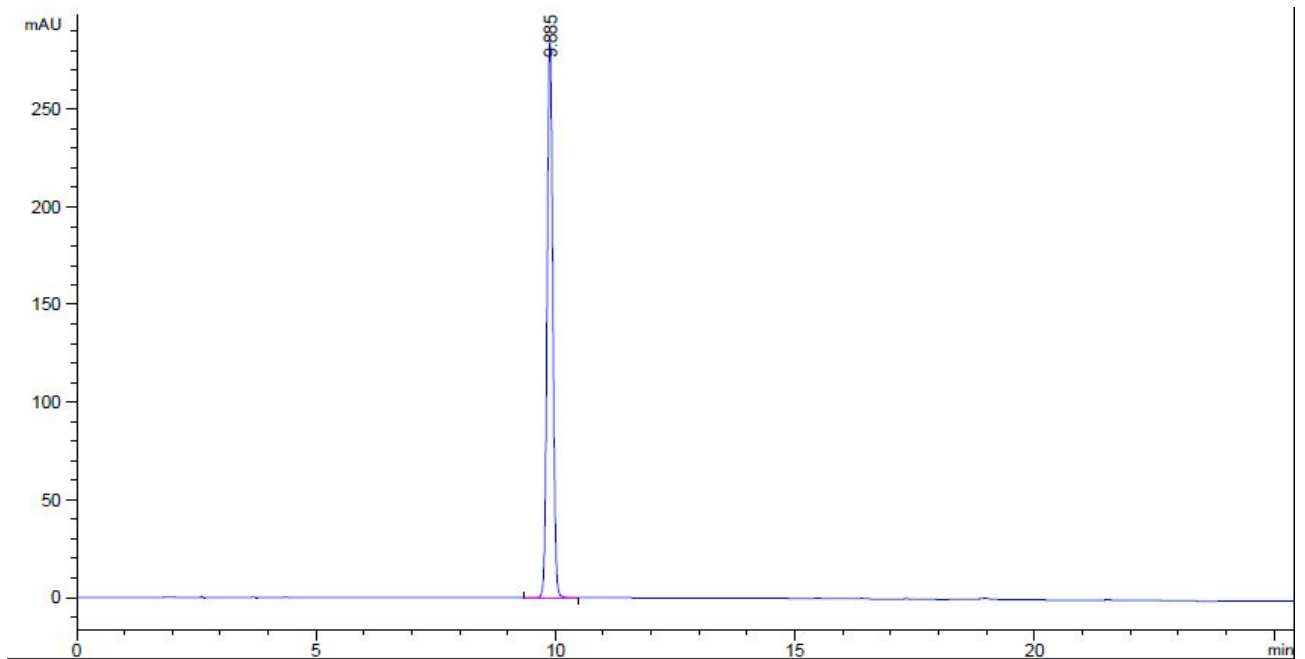
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
4.515	-	2000.52661	290.59509	0.82	0.1033	10569	-	-

## 2、谷氨酸



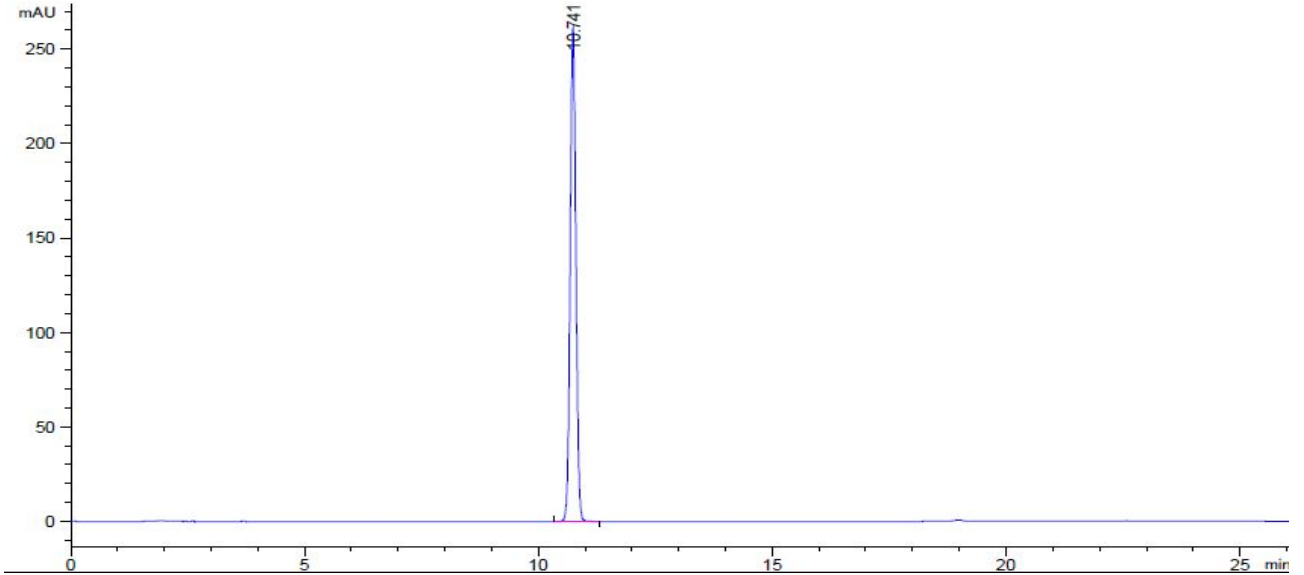
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
5.273	-	1831.47107	299.62405	0.92	0.0938	17517	-	-

## 3、丝氨酸



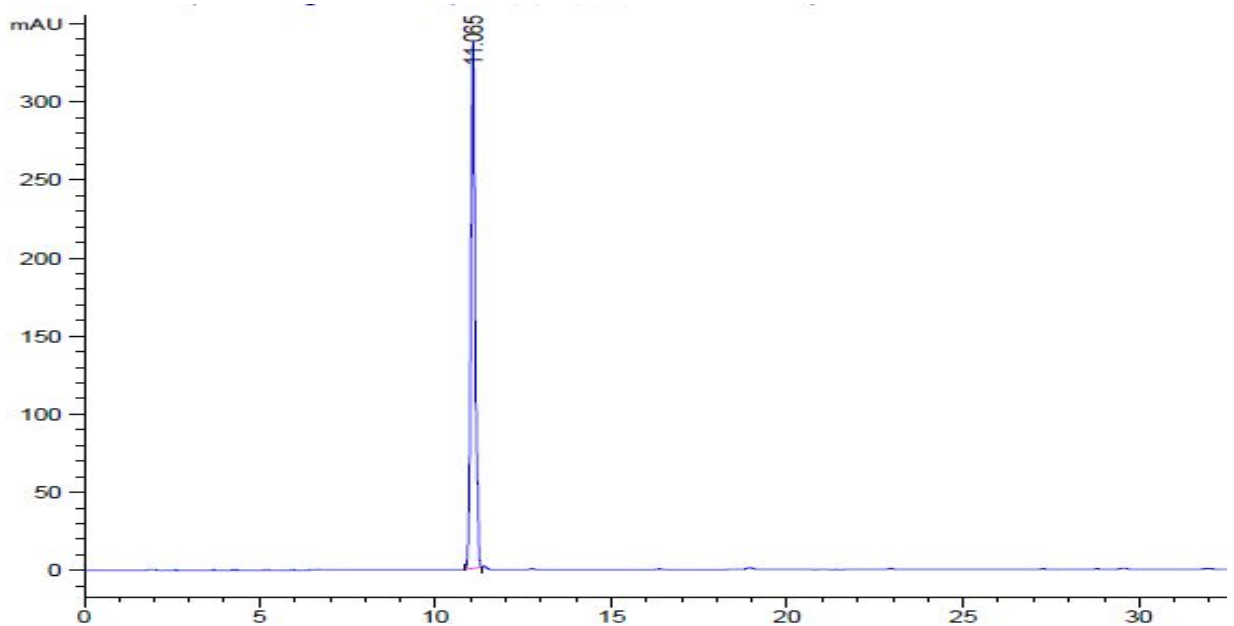
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
9.885	-	2328.29419	284.32843	0.92	0.1261	34027	-	-

#### 4、甘氨酸



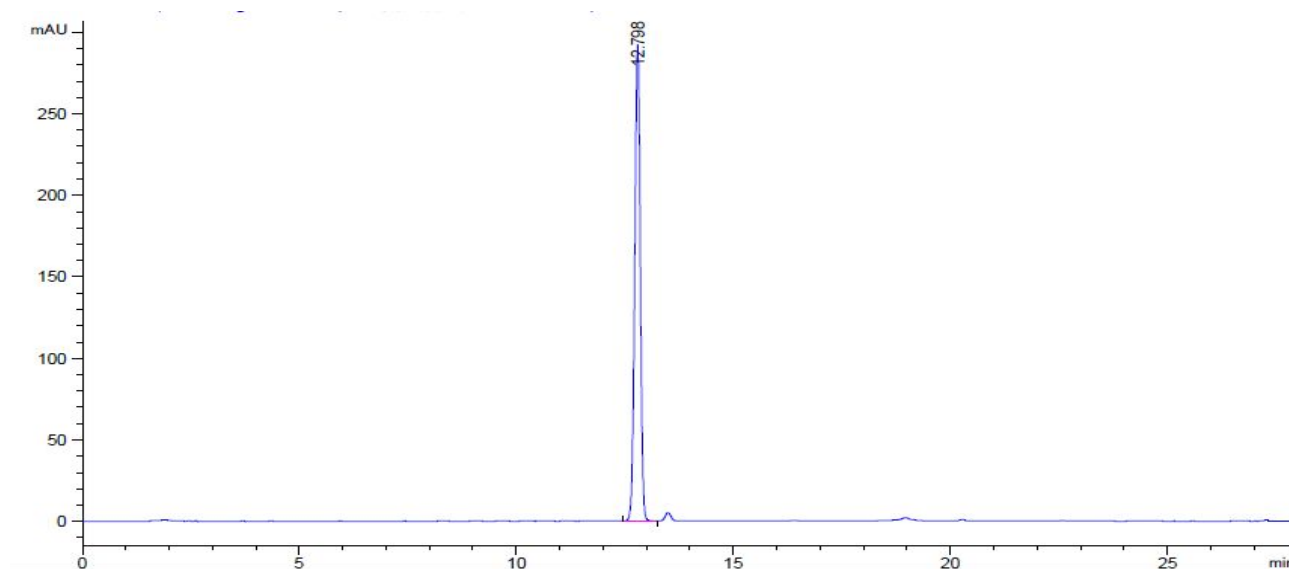
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
10.741	-	2224.68530	261.23840	0.92	0.1312	37140	-	-

#### 5、组氨酸



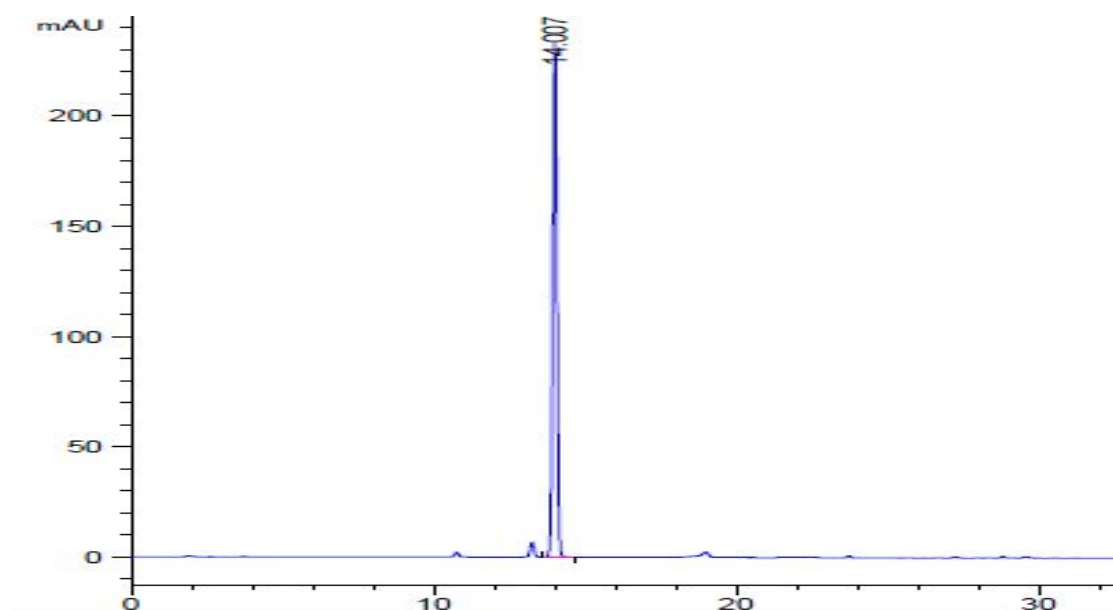
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
11.065	-	2869.53174	337.43863	0.91	0.1245	43752	-	-

## 6、精氨酸



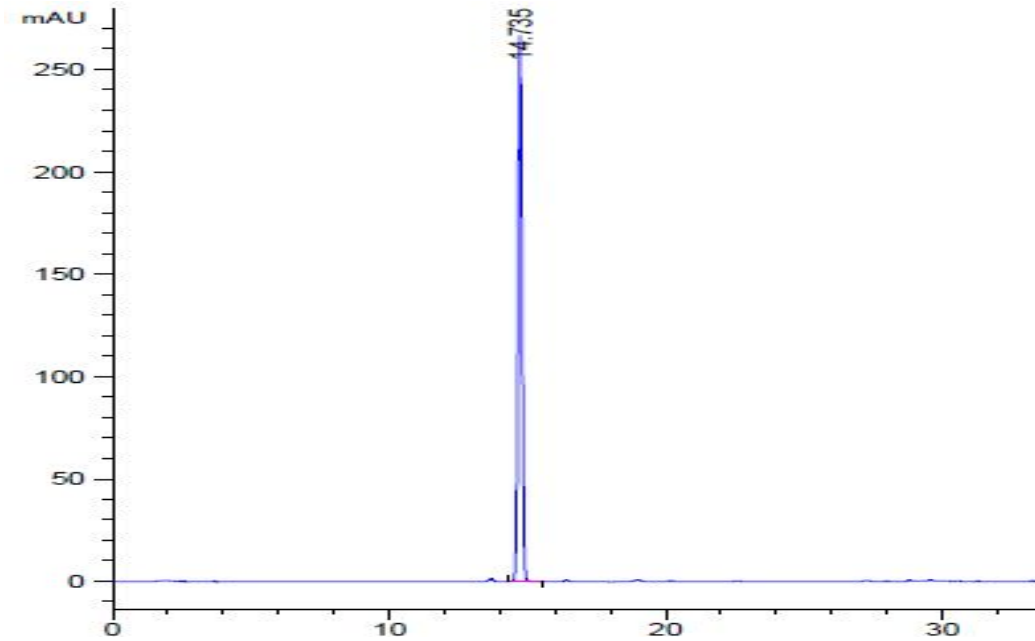
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
12.798	-	2590.09570	292.06168	1.05	0.1371	48297	-	-

## 7、苏氨酸



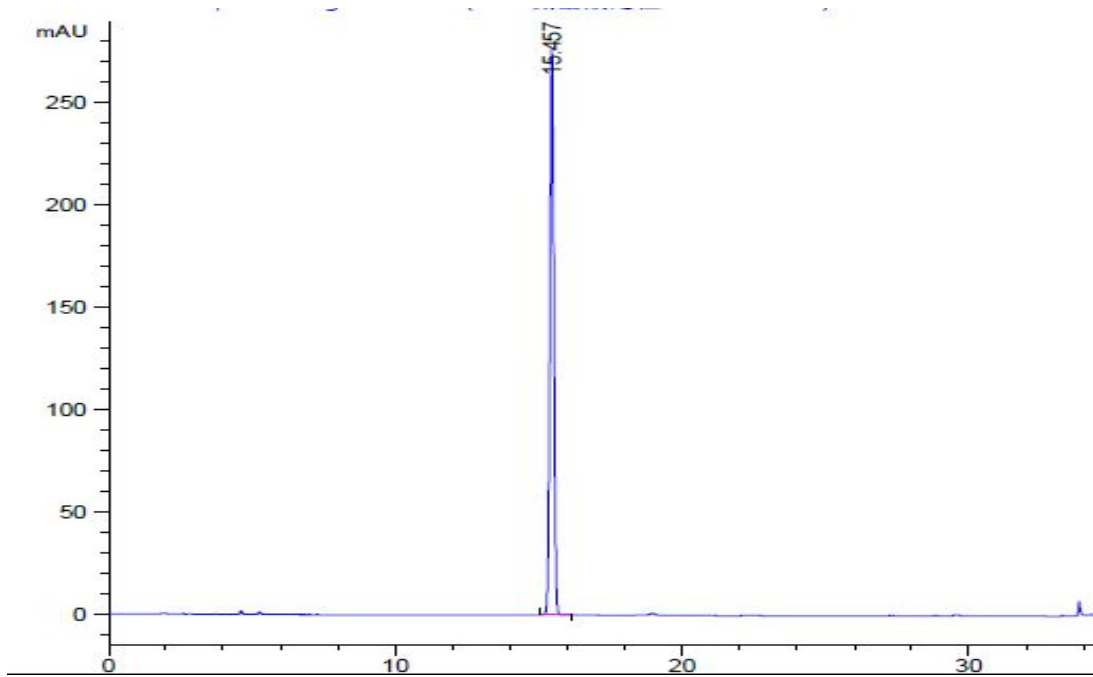
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
14.007	-	2219.84595	233.70331	0.90	0.1468	50463	-	-

### 8、丙氨酸



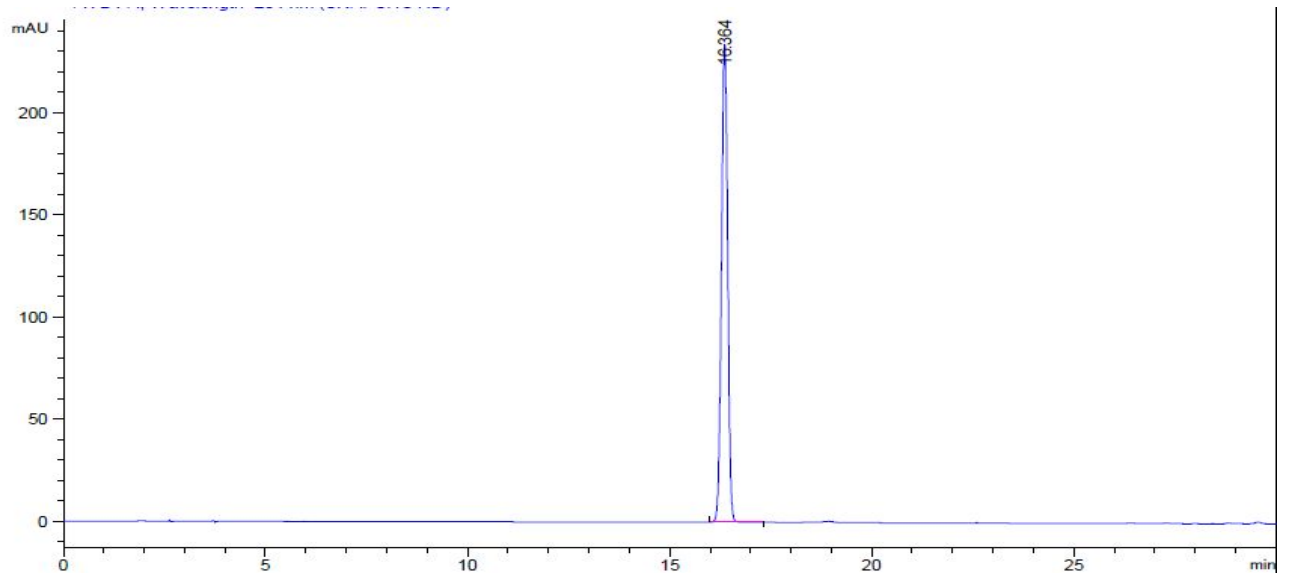
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
14.735	-	2613.28857	266.76801	0.87	0.1514	52463	-	-

### 9、脯氨酸



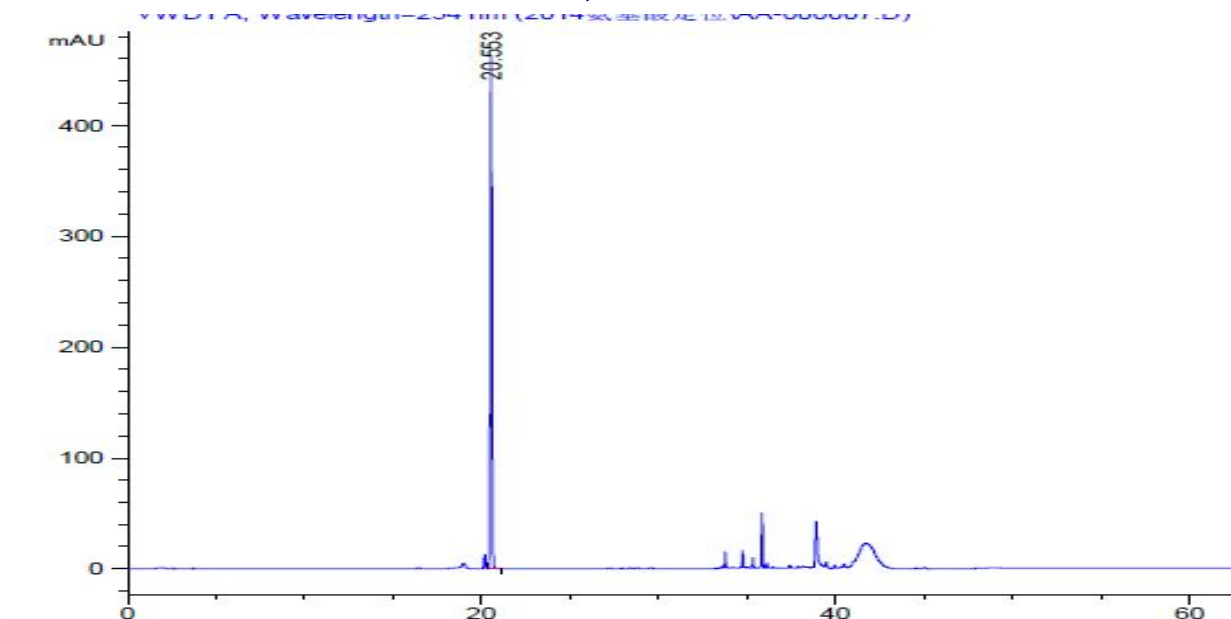
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
15.457	-	2650.38184	276.18118	0.88	0.1483	60220	-	-

### 10、氯化铵



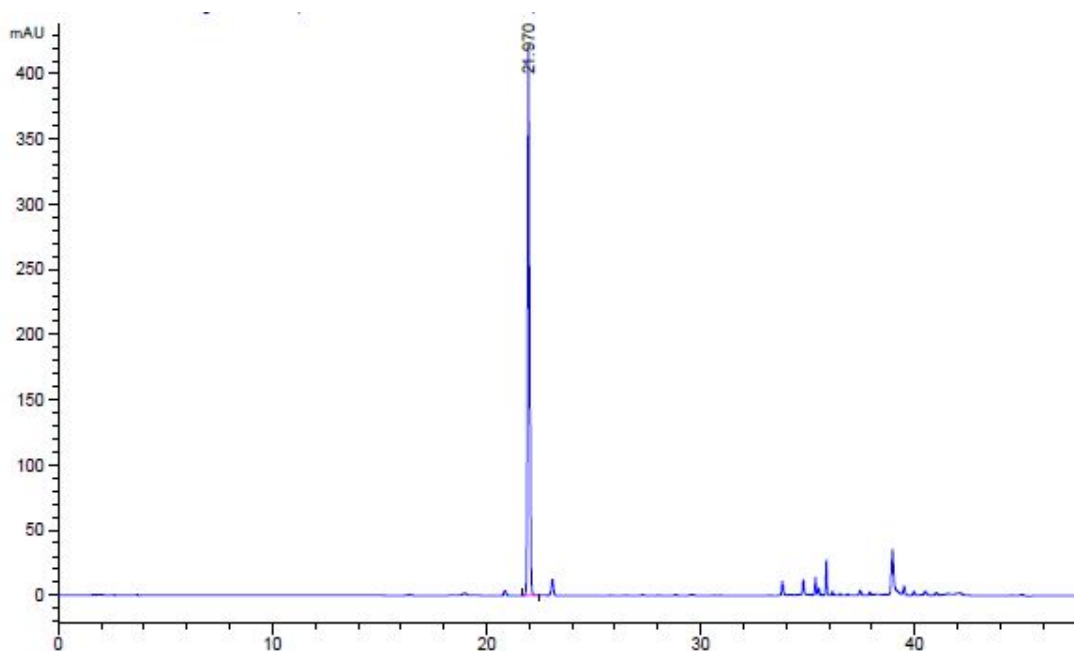
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
16.364	-	2499.55225	234.06590	1.01	0.1652	54324	-	-

### 11、酪氨酸



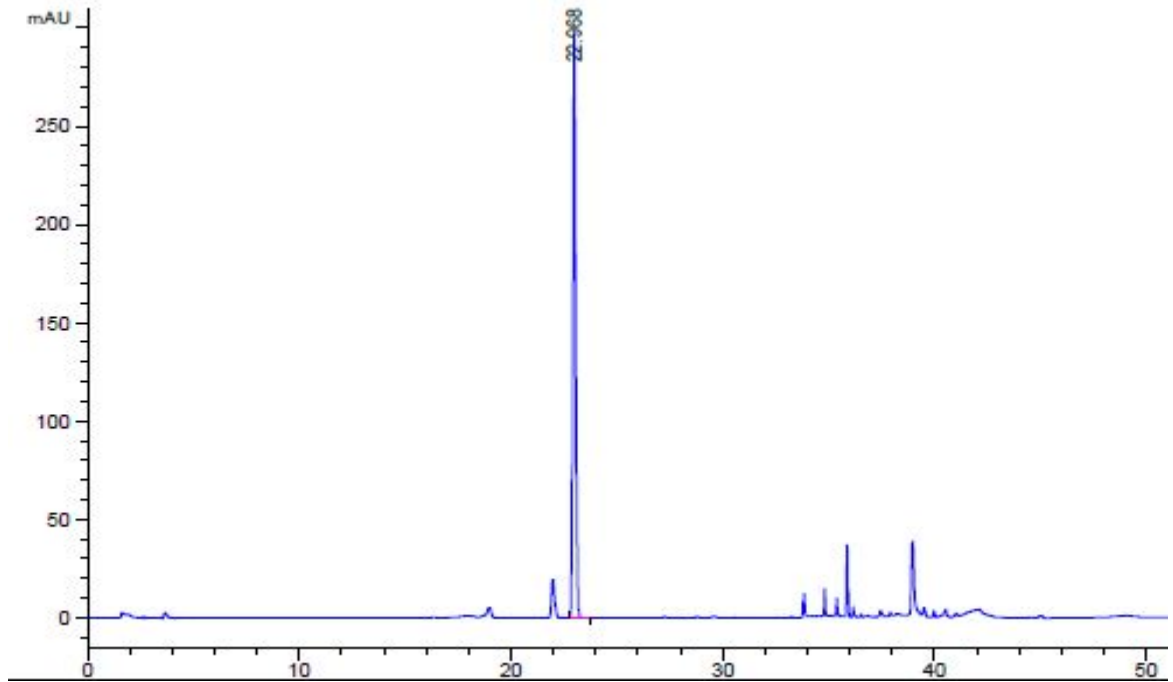
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
20.553	-	2917.88672	461.50989	0.89	0.0978	244682	-	-

## 12、缬氨酸



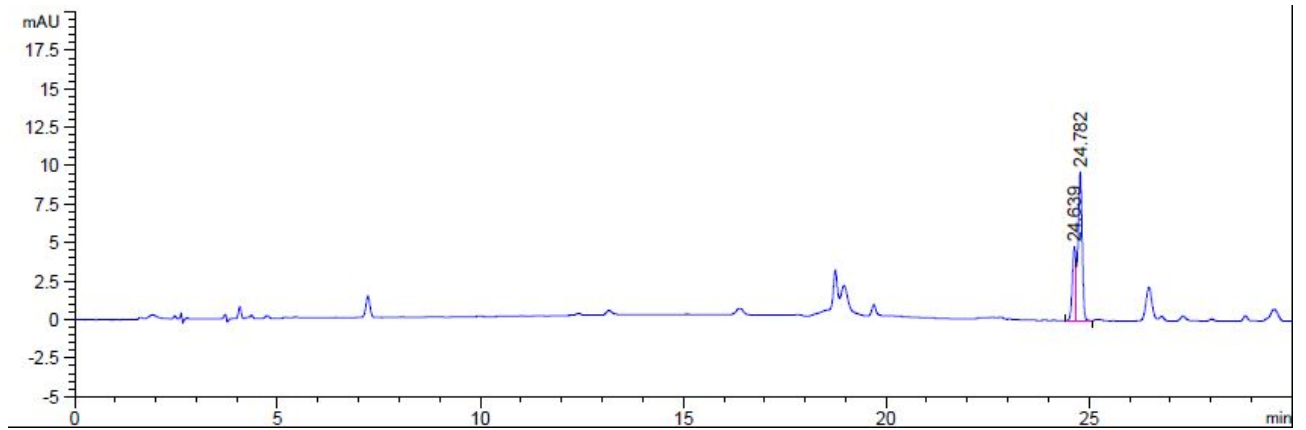
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
21.970	-	2870.49707	418.02661	0.88	0.1060	237964	-	-

## 13、蛋氨酸



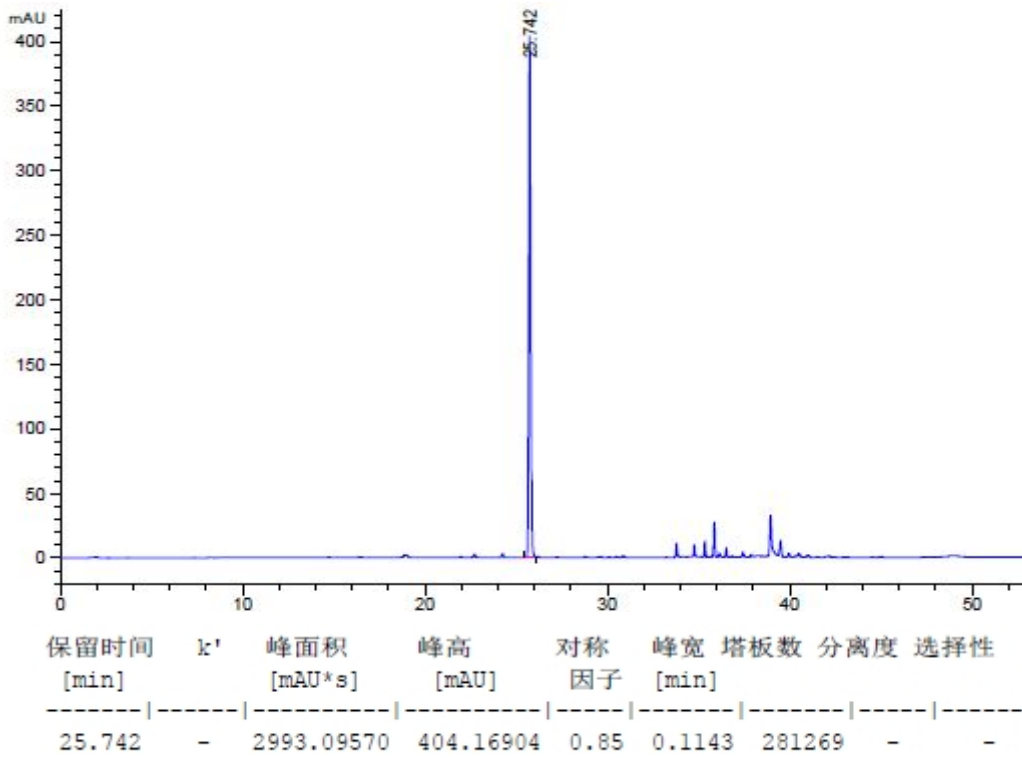
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
22.968	-	2735.13965	295.21500	0.73	0.1426	143697	-	-

#### 14、胱氨酸

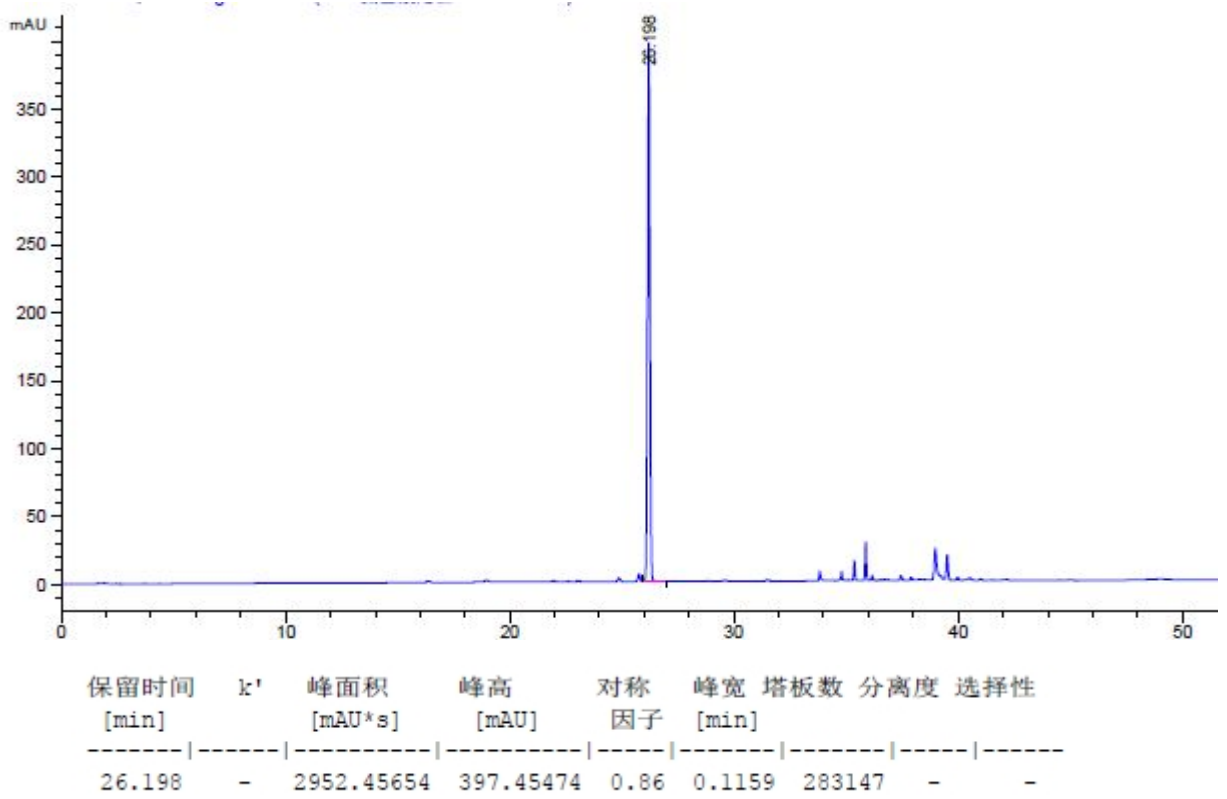


保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
24.639	-	30.27257	4.80767	1.25	0.1077	290078	-	-
24.782	-	66.92691	9.66494	1.01	0.1100	281218	0.77	1.01

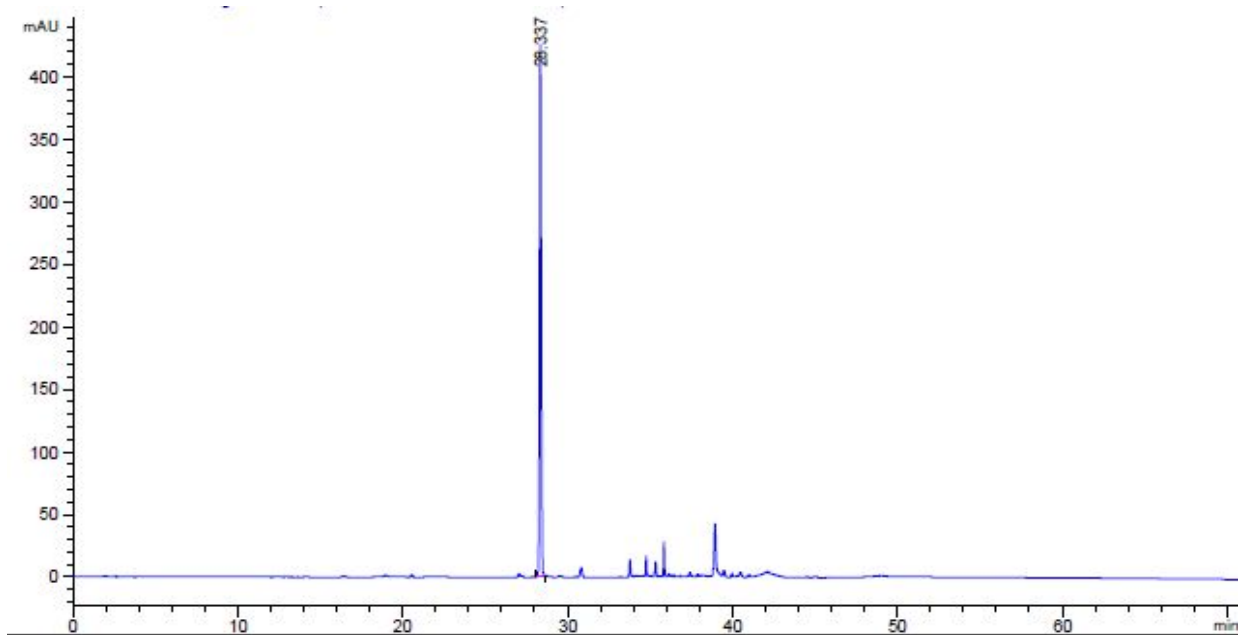
#### 15、异亮氨酸



16、亮氨酸

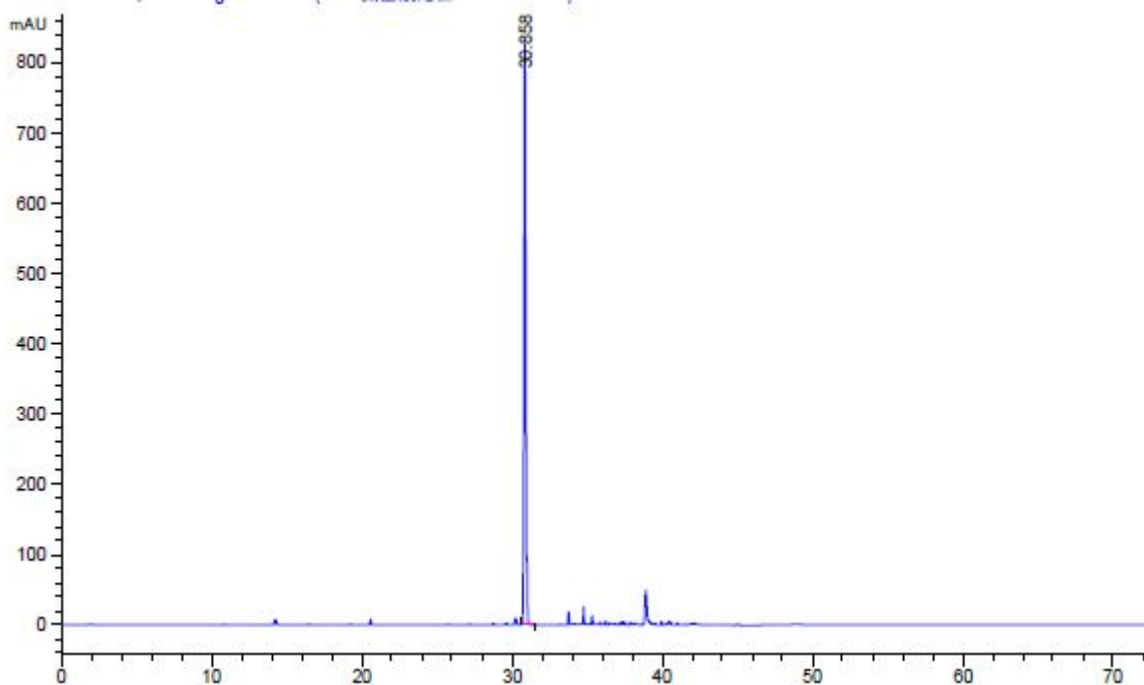


17、苯丙氨酸



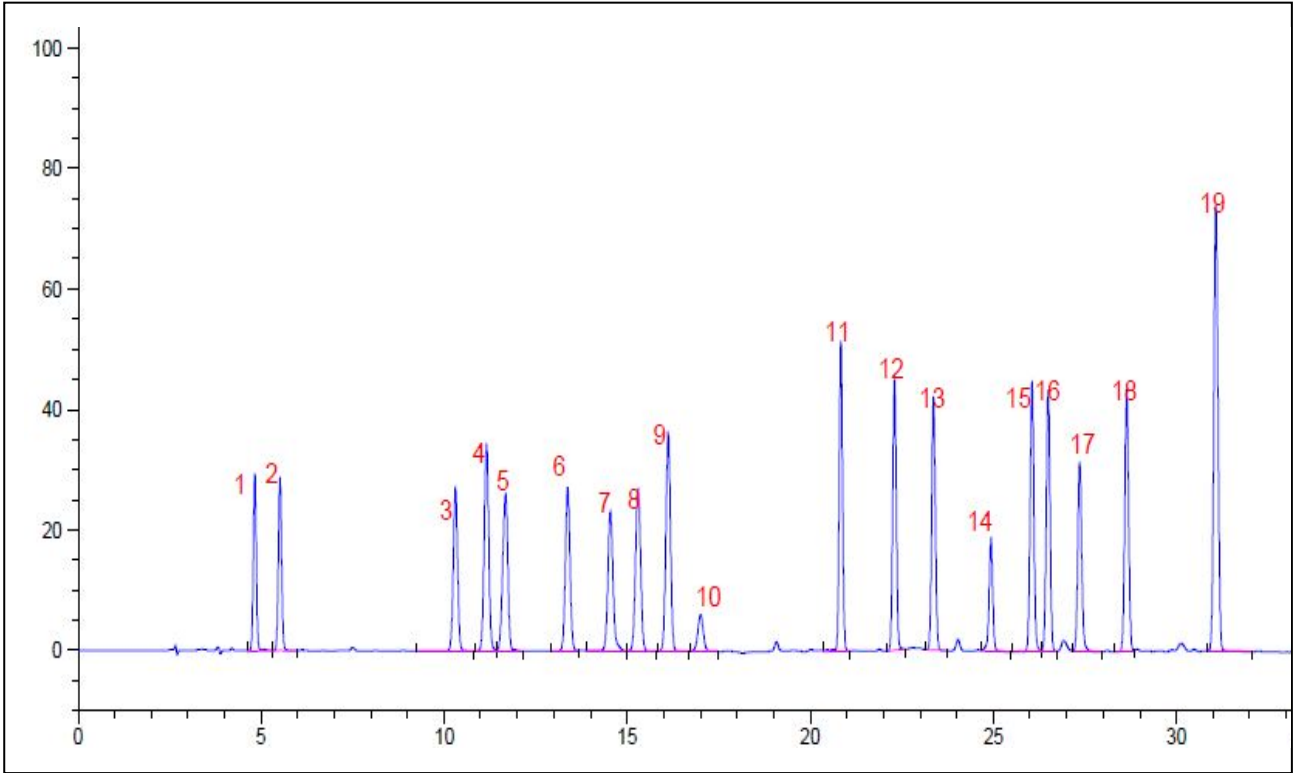
保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
28.337	-	3216.76953	426.01379	0.83	0.1172	323858	-	-

### 18、赖氨酸



保留时间 [min]	k'	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	对称 因子	峰宽 [min]	塔板数	分离度	选择性
30.858	-	7491.65576	827.08099	0.93	0.1417	262773	-	-

色谱图：18种氨基酸+内标物质（正亮氨酸）



1. 门冬氨酸
2. 谷氨酸
3. 丝氨酸
4. 甘氨酸
5. 组氨酸
6. 精氨酸
7. 苏氨酸

8. 丙氨酸
9. 脯氨酸
10. 氯化铵
11. 酪氨酸
12. 缬氨酸
13. 蛋氨酸
14. 胱氨酸

15. 异亮氨酸
16. 亮氨酸
17. 正亮氨酸
18. 苯丙氨酸
19. 赖氨酸