

用于氨基酸分析的HPLC柱前衍生化方法研究进展

韩宁娟 方欢乐 牛睿 刘荣利 陈彦君

(西安培华学院 陕西西安 710125)

摘要: 本文阐述了近年来柱前衍生化高效液相色谱法检测氨基酸的方法, 重点介绍了氨基酸衍生化试剂, 衍生条件、色谱检测条件等内容。通过衍生化试剂衍生方法的特点进行分析, 为中药、食品、生物样品中氨基酸的分析提供依据。

关键词: 柱前衍生化; 高效液相色谱法; 氨基酸

Research progress of HPLC pre-column derivatization method for amino acid analysis

Han Ning-juan, Fang Huan-le, Niu Rui, Liu Rong-li, Chen Yan-jun

(Xi'an Peihua University, Shaanxi Xi'an 710125)

In this paper, the methods for the detection of amino acids by pre-column derivatization high performance liquid chromatography in recent years are reviewed, and the amino acid derivatization reagents, derivatization conditions, and chromatographic detection conditions are mainly introduced. The analysis is carried out through the characteristics of the derivatization method of the derivatization reagent, which provides the basis for the analysis of amino acids in traditional Chinese medicine, food and biological samples.

氨基酸是蛋白质的基本结构单位, 也是能量来源, 直接参与细胞信号传导, 营养细胞特异性代谢, 氧化应激和膳食蛋白利用效率。氨基酸的定量分析在许多领域都是必需的, 包括生物医学研究、生物工程和食品科学。虽然已经有很多氨基酸定量分析方法已经开发出来并商业化, 但是, 现有方法在分析速度、灵敏度、重复性等方面仍需努力。

氨基酸的种类繁多, 有些不具有紫外或荧光信号, 无法定量分析。柱前衍生液相色谱法是柱前衍生化方法, 其中氨基酸在进入色谱柱之前用发色团或荧光团衍生化, 提高其疏水性, 衍生化的氨基酸可以在反相柱上分离, 导致比常规离子交换方法更快的分析和更高的灵敏度。常用的衍生化试剂有异硫氰酸苯酯、2, 4- 二硝基氟苯、邻苯二甲醛和 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基酸酯等试剂都可作为氨基酸衍生化试剂。

本文从样品衍生化试剂、衍生化技术条件、高效液相色谱条件要求等多个方面对进行的综合的阐述, 通过总结衍生化试剂、衍生化方法等特点, 可为从事中药、食品、生物样品分离中氨基酸分析提供技术参考。

1 异硫氰酸苯酯作为衍生化试剂^[1-6]

以异硫氰酸苯酯作为衍生化试剂检测氨基酸的含量, 异硫氰酸

苯酯 (phenylisothiocyanate, PITC) 在三乙胺形成碱性环境下, 与游离和水解的氨基酸发生定量反应, 形成稳定的具有强紫外吸收的苯硫胺基氨基酸衍生物, 每个氨基酸只生成一个产物。因过量的试剂和副产物会干扰检测, 一般会加入正丁醇萃取未反应完的 PITC 和副产物减小干扰。采用柱前衍生高效液相色谱法分析了大鼠血浆、尿液、脊髓液、哺乳动物组织样本中的 AAS 水平。异硫氰酸苯酯可与氨基酸在室温条件下快速反应, 生成稳定的含苯基的 PTC-AA 衍生物, 因此仅需简单的液相色谱结合紫外检测器即可实现高灵敏度检测。但是 PITC 痕量残留的衍生剂会造成分析柱寿命缩短。

1.1 色谱条件

异硫氰酸苯酯作为衍生化试剂的高效液相色谱条件, 用乙腈或甲醇-水, 加入适量的 pH6.5 醋酸盐缓冲溶液作为流动相, 流速 1.0ml/min, 柱温 35-43℃, 进样体积 20 μL, 可达到分析要求。

1.2 衍生化条件

以异硫氰酸苯酯为衍生化试剂测定氨基酸含量的衍生化条件为: 用比样品溶液体积高 5 倍的 1.0 mol/L 的异硫氰酸苯酯乙腈溶液, 在 1.0 mol/L 三乙胺乙腈溶液催化下反应 1h, 用与反应液等体积的正己烷或正丁醇萃取未反应完的 PITC 及副产物, 室温下放置 10 分钟后即可。

表 1 柱前衍生试剂比较

衍生试剂	与仲胺反应	氨基酸衍生物的稳定性	色谱分析前需要去除多余试剂
PITC	是	室温 1 周	不必要
AQC	是	室温 1 周	不必要
NBD-F	是	不稳定	必要的
FMOC-Cl	是	室温 30 小时	必要的
OPA	否	不稳定	不必要

2 2, 4- 二硝基氟苯作为衍生化试剂

2, 4- 二硝基氟苯 (DNFB) 为衍生剂, 氨基酸与其反应后得到二硝基苯氨基酸 (DNP-氨基酸), DNP-氨基酸在紫外线 360nm 处有较强的吸收, 且较稳定, 不易分解, 能满足 HPLC 法分离和检测的要求。但 DNFB 的纯度对于柱前衍生化高效液相色谱法含量测定具有影响较大, 且 DNFB 易于氧化变色, 宜冷藏备用, 且因其有剧毒和致癌性, 故试验时应做好防护工作。

2.1 色谱条件

以 DNFB 为衍生化试剂^[7-10]色谱条件, 流动相采用乙腈-水体系, 加入乙酸铵, 乙酸, 以 C18, ODS 柱为色谱柱, 流速 1.0ml/min, 柱温 25-30℃, 进样体积 20 μL, 检测波长为 360nm。

2.2 衍生化条件

以 DNFB 为衍生化试剂测定氨基酸含量的衍生化条件为: 用比样品溶液体积高 5 倍的 1% 的 DNFB 乙腈溶液, 在 50.0mmol/L NaHCO₃

乙腈溶液催化下反应 60℃ 恒温避光水浴 30min, 冷却至室温后, 加入 0.2% 甲酸水溶液涡旋离心 10min 后, 取上清液即得。

3 邻苯二甲醛 (OPA) 为衍生化试剂

邻苯二甲醛 (OPA) 进行了阳离子交换色谱柱后衍生和反相高效液相色谱柱前衍生。在硫醇 (如巯基乙醇) 存在下, OPA 与氨基酸化合物反应形成荧光衍生物。OPA 衍生物可通过 340 nm 的紫外吸收、340 nm 和 450 nm 的激发和发射波长的荧光测定和/或对荧光活性很少或没有荧光活性的 OPA 衍生物的安培测定来检测。

OPA 衍生氨基酸反应迅速, 易于实现在线自动化, 但是在不存在催化剂的前提下, 邻苯二甲醛 (OPA) 仅与伯胺反应, 且与氨基酸形成络合物不稳定。因此, 在碱性条件下, 在没有氧化剂如次氯酸盐的情况下, 不能用 OPA 直接检测到氨基酸脯氨酸和羟脯氨酸。

3.1 色谱条件

(下转第 52 页)

(上接第 48 页)

以 OPA 为衍生化试剂[11-15]色谱条件,流动相采用乙腈-甲醇-水体系,有的加入磷酸二氢钠、四氢呋喃,以 C_{18} 柱为色谱柱,流速 1.0ml/min,柱温 25℃,将样品、硼酸缓冲液、氯甲酸-9-苄基甲酯溶液混合进样,进样体积 20 μ L,检测波长为 262nm。

4 AQC 作为衍生化试剂

6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺基甲酸酯(AQC)可与伯胺和仲胺(包括脯氨酸和羟脯氨酸)反应生成稳定的衍生物,过量的试剂立即水解生成6-氨基喹啉(AMQ)。尽管AMQ具有与AQC衍生物相同的激发最大值,但AMQ的发射最大值与AQC衍生物的发射最大值不同。发射最大值的差异允许在存在大量过量AMQ的情况下选择性检测AQC衍生物。因此,在注入反相柱之前除去过量的试剂变得不必要。

5 讨论

此外,衍生化试剂还有 4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯、丹酰氯、2,4-二硝基氟苯等。HPLC 柱前衍生化分析的痕量氨基酸涉及到中药、食品和生物等领域。柱前衍生化高效液相色谱法采用的色谱柱有 C_{18} 柱、氨基酸分析柱等。检测器有紫外检测器和荧光检测器,经过衍生化高效液相色谱后的氨基酸的检测有的可达 ng 水平。现有报道中,以 PITC 或 OPA 为衍生化试剂,在 C_{18} 柱上,通过紫外检测器或荧光检测器均可以实现 20 种痕量基本氨基酸的分析检测,可为痕量氨基酸的分析检测方法提供参考。

采用柱前衍生化分析氨基酸,衍生化试剂的稳定性、衍生化产物的稳定性、色谱柱的类型、检测器等都会影响结果的准确性,该方法的重复性是确保方法准确性的关键指标。

参考文献

[1]张凡,周远征,赵远,等. HPLC 异硫氰酸苯酯柱前衍生化测定黄柏及其不同炮制品中 17 种氨基酸的含量[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (09): 2259-2262.

[2]王旭波,徐利丽,郑洁,等. 柱前衍生化-HPLC 法测定市售 3 种胶类药材中 L-羟脯氨酸和胶原蛋白的含量[J]. 中国药房, 2017, 28 (27): 3824-3827.

[3]郝经文,王荣花,徐文冬,等. 柱前衍生化 HPLC 同时测定霍山石斛中 13 种游离氨基酸含量[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30 (11): 1849-1857.

[4]祝洪艳,张荻,张力娜,等. 柱前衍生化 HPLC 法检测紫苏子和紫苏叶中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (10): 1858-1864.

[5]Guo J G, Guo X M, Wang X R, et al. Metabolic profile analysis of free amino acids in experimental autoimmune uveoretinitis rat plasma[J]. Int J Ophthalmol, 2019, 12 (1): 16-24.

[6]贾鹏禹,孙蕊,寇芳,等. 柱前衍生化液相色谱法测定牛血清中游离氨基酸含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31 (08): 869-873.

[7]李奇娟,张彩丽,王战国,等. 采用柱前衍生化法研究康复新液不同制备环节中氨基酸成分轮廓差异[J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (12): 2068-2075.

[8]张微,张振秋,李瑞海,等. 马鹿茸不同分子量肽段中水解及游离氨基酸的含量分析[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35 (08): 2039-2042.

[9]姚佳佳,闫晨. 柱前衍生化法同时测定人凝血因子 VIII 中甘氨酸和盐酸赖氨酸的含量[J]. 药学实践杂志, 2018, 36 (04): 362-364.

[10]尹昭晔,王优,刘湘,等. 柱前衍生化法测定雀脑中丙氨酸的含量[J]. 中医药导报, 2018, 24 (09): 42-44.

[11]谢志茹,程敏,谭丽容,等. OPA-FMOC 柱前衍生化 HPLC 法测定两种常用食用菌中蛋白氨基酸和非蛋白氨基酸的含量[J]. 现代食品科技, 2018, 34 (10): 240-246.

[12]邵天舒,郭雷,周长明. 邻苯二甲酰柱前衍生化-HPLC 测定复方氨基酸注射液中蛋氨酸亚砷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35 (04): 497-500.

基金项目: 2020 年西安培华学院校级课题“二甲双胍丝素蛋白-壳聚糖缓释微球的制备与应用”项目编号 (PHYT2075)。

作者简介: 韩宁娟 (1985.2), 女, 陕西杨凌人, 研究生, 副教授, 研究方向: 药物分析。